

**Untersuchung von
S1-Nuclease-sensitiven Stellen
im Genom der Hefe
Saccharomyces cerevisiae
nach in vivo-Bestrahlung
mit Gamma-Strahlen**

Eva-Maria Geigl

Disbui. München

1987



UNTERSUCHUNG VON S1-NUCLEASE-SENSITIVEN STELLEN IM
GENOM DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE NACH
IN VIVO-BESTRAHLUNG MIT GAMMA-STRAHLEN

Dissertation der Fakultät für Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

durchgeführt in der Gesellschaft für Strahlen-
und Umweltforschung, Neuherberg
Institut für Strahlenbiologie

vorgelegt von
Eva-Maria Geigl

im Mai 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ulrich Hagen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.87

ALLGEMEINE EINFÜHRUNGTeil I VORVERSUCHE UND OPTIMIERUNGEN

1.	EINLEITUNG	15
1.1.	<u>DNS-Isolierungsmethoden</u>	15
1.2.	<u>Methoden der Strangbruchanalyse</u>	17
1.2.1.	Analytische Ultrazentrifugation	17
1.2.2.	Sedimentation im Sucrose-Dichtegradienten	17
1.2.3.	Konventionelle Agarosegelelektrophorese	17
1.2.4.	Gepulste Gelelektrophorese	18
1.3.	<u>Allgemeine Optimierung der Sl-Nuclease-Reaktion</u>	21
1.4.	<u>Sl-Aktivität in Agarose</u>	21
1.5.	<u>Reproduzierbarkeit der Lysatherstellung</u>	21
2.	ERGEBNISSE	
2.1.	<u>Vorversuche und Optimierungen</u>	23
2.1.1.	Analytische Ultrazentrifugation	23
2.1.2.	Konventionelle Agarosegelelektrophorese	23
2.1.3.	Sucrosegradienten-Sedimentation	24
2.1.4.	CFAGE	25
1.2.	<u>Spezifität der Sl-Nuclease-Bedingungen für die Sl-Nuclease-sensitiven Stellen</u>	29
2.2.1.	Sl-Nuclease-Aktivität gegenüber DNase-erzeugten Einzelstrang-Nicks	29
2.2.2.	Sl Nuclease-Aktivität gegenüber Gamma-induzierten Einzelstrang-Nicks	31
2.3.	<u>Untersuchung der Substratspezifität der Nuclease Sl</u>	33
2.4.	<u>Optimierung der Sl-Nuclease-Reaktion in Agarose</u>	
2.4.1.	Inhibierung der Proteinase K	39
2.4.2.	Nachweis der Sl-Nuclease-Aktivität an partiell hitzedenaturierter Hefe-DNS in Lysat-Blöckchen	40
2.4.3.	Doppelstrang-Exonuclease-Aktivität der Sl-Nuclease	41
2.4.4.	Nachweis der Sl-Nuclease-Aktivität an ds Lambda-DNS und ss M13-DNS	42
2.4.5.	Einfluß von PMSF auf den Sl-Verdau von Lambda-DNS in Agarose	43
2.4.6.	Vergleich des Einflusses von PMSF auf Lambda-DNS und M13-DNS in Agarose	44
2.4.7.	Einfluß des Proteinase K-Inhibitors PMSF auf den Sl-Verdau von Hefe-Lysaten	46
2.4.8.	Kontrollexperiment zum Sl-Verdau von Hefelysaten	48
2.5.	<u>Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Lysatherstellung</u>	49
3.	DISKUSSION	51

Teil.II	<u>Untersuchung von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen im 2um-Ring der Hefe S.cerevisiae nach in vivo- Bestrahlung mit Gamma-Strahlen</u>	
1.	EINLEITUNG	52
2.	ERGEBNISSE	57
2.1.	<u>Untersuchung von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen im 2um-Ring durch Hybridisierung von gesamt-genomischer DNS mit YEp2</u>	59
3.	DISKUSSION	64
Teil III	<u>Untersuchung von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen im Kerngenom der Hefe S. cerevisiae nach in vivo- Bestrahlung mit Gamma-Strahlen</u>	
1.	EINLEITUNG	68
2.	ERGEBNISSE	70
2.1.	<u>Anwendung der OFAGE auf Sl-Nuclease behandelte Lysate des Wildtyp-Stammes</u>	70
2.2.	<u>Analyse von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen am circulären Chromosom III</u>	75
2.3.	<u>Verhalten unterschiedlich großer Chromosomen nach Bestrahlung und Sl-Verdau</u>	79
2.4.	<u>Dosis-Effekt-Beziehungen von Sl-Sites in verschiedenen Mutanten von S. cerevisiae</u>	81
2.4.1.	Überlebenskurven	81
2.4.2.	Dosis-Effekt-Kurven bezüglich Sl-sites und Doppelstrangbrüchen in Reparaturmutanten	84
2.5.	<u>Untersuchung einer spezifischen Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen</u>	94
2.5.1.	System der sauren Phosphatase PHO5	94
2.5.2.	System der Alkoholdehydrogenase II ADH2	101
2.5.3.	Transposons im ADH4-Gen	102
2.5.4.	Zentromerregion von Chromosom IV und VI	103
2.6.	<u>Analyse von Reparaturprozessen der Sl-Nuclease-sensitiven Stellen in Hefe</u>	109
2.6.1.	Überlebenskurven	109
2.6.2.	Strangbruchanalyse in der OFAGE nach LHR	111
3.	DISKUSSION	126
	<u>ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION</u>	128
	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	

Teil IV MATERIAL UND METHODEN

1.	<u>Stämme</u>	138
2.	<u>Plasmide</u>	138
3.	<u>Anzuchtbedingungen für Hefen</u>	140
4.	<u>Bestrahlungsbedingungen</u>	140
5.	<u>Überlebenskurven</u>	141
6.	<u>Präparation von Hefe-DNS</u>	
6.1.	Isolierung von gesamtgenomischer DNS aus Hefe	141
6.2.	Herstellung von Agaroselysaten	141
6.3.	Plasmidisolierung aus E. coli	142
6.4.	Präparation einer Lambda-Ladder	143
7.	<u>Enzymreaktionen</u>	143
8.	<u>Agarose-Gelelektrophorese</u>	144
9.	<u>Southern-Hybridisierung</u>	146
10.	<u>Indirekte End-Markierung</u>	147
11.	<u>Herstellung von Heteroduplex-M13-DNS</u>	147

<u>LITERATUR</u>	152
------------------	-----



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0010

Liste häufig verwendeter Abkürzungen:

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
bp	Basenpaare
D	Dalton
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Di-Natrium-Ethylendiamin-Tetraacetat
E.coli	Escherichia coli
h	Stunde
kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertoni-Medium
LHR	Liquid Holding Recovery
M	Molar
OFAGE	Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis
PHO	Gene für die saure Phosphatase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAD	(Radiation)=Gene für die Reparatur von Strahlenschäden
t	Zeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	"unit", Einheit
um	Micrometer
Upm	Umdrehungen pro Minute
YPD	Hefe-Vollmedium

Entsprechend dem in den Computerzeichnungen verwendeten Dezimalpunkt statt eines Kommas, wie es im Deutschen üblich wäre, wurde der im angloamerikanischen Sprachraum übliche Dezimalpunkt im gesamten Text der Arbeit verwendet.

ALLGEMEINE EINFÜHRUNG

Die DNS-Moleküle aller Organismen sind die Informations-träger für das Phänomen "Leben", d.h. für Wachstum, Entwicklung, Reproduktion. Diese Makromoleküle erfahren fortwährend spontan auftretende und von der Umgebung induzierte Schädigungen ihrer Struktur und damit häufig ihres Informationsgehaltes.

Die Information, die in der doppelsträngigen DNS festgelegt ist, wird während der Replikation und der Transkription weitergegeben, indem die beiden Stränge der Doppelhelix separiert werden. Die Basensequenz eines Stranges fungiert dann als Matrize für die Synthese des komplementären DNS- oder RNS-Moleküls. Veränderungen in der DNS interferieren mit dieser Template-Aktivität. Strukturelle Veränderungen (Intra- und Inter-Strang-Cross-Links, Strangbrüche oder größere Addukte von Agentien an die DNS) können Replikation und Transkription hemmen, oft mit tödlichem Ausgang für die Zelle. Schäden, die den genetischen Code verändern können, wie Basenveränderungen oder fehlende Basen, können zu vererbaren Phänotyp-Veränderungen, sog. Mutationen, führen.

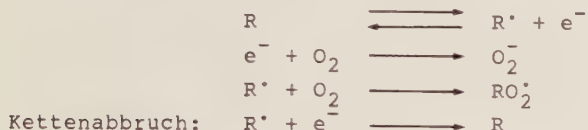
Neben Chemikalien ist Strahlung das Hauptagens, das zu DNS-Schädigungen führt. Angesichts der zunehmenden Belastung der Umwelt und damit aller lebenden Organismen mit chemischen mutagenen und cancerogenen Giften und strahlender Materie durch Nutzung von Kernspaltung und in der medizinischen Diagnostik ist das Verständnis der molekularen Vorgänge, die DNS-Veränderungen in der Zelle verursachen, und der Antworten, die die Zelle auf diese Schädigungen findet, von allgemeinem bedeutendem Interesse.

Bestrahlung von Zellen mit Ultravioletem Licht (UV, 220-300 nm) bewirkt eine Vielzahl verschiedener DNS-Läsionen. Hierzu zählen Cyclobutyl-Dimere zwischen benachbarten Pyrimidinresten, die zu Helix-Verzerrungen führen, Alkali-labile Läsionen benachbarter Pyrimidine, den Vorläufern der 6,4-Photoprodukte. Diese Photoprodukte scheinen den Hauptanteil der die UV-induzierte Änderung des genetischen Codes verursachenden Schädigungen auszumachen (Brash und Haseltine 1982; Haseltine 1983; Franklin und Haseltine 1986).

Ionisierende Strahlung, vor allem Röntgen- und Gamma-Strahlung, verursacht eine große Anzahl von Schäden in der DNS bestrahlter Zellen und Organismen, die in zwei große Klassen eingeteilt werden, nämlich den indirekten und den direkten Strahlenschäden, und bei Hagen 1985 in der Übersicht dargestellt sind.

Erfolgt die Absorption der Strahlenenergie nicht im DNS-Molekül selbst, sondern in beliebigen anderen Molekülen der Zelle, hauptsächlich Wassermolekülen ("Radikolyse"), und schädigen diese die DNS, so spricht man von "indirekter Strahlenwirkung". Die Anregung durch die Strahlung und die Antwort auf diese Energie finden in verschiedenen Molekülen statt. Das Ausmaß der durch diese Radikalreaktionen entstehenden DNS-Schäden, wie Einzelstrangbrüche und Veränderungen an den Zucker- und Basenbausteinen der DNS, ist daher von der Konzentration der DNS-Moleküle in der wässrigen Lösung abhängig. Bestrahlung in Gegenwart von Sauerstoff führt dazu, daß die durch die Wechselwirkung der Strahlen mit Biomolekülen (R) freigesetzten hydratisierten Elektronen (e^-) sehr rasch mit O_2 reagieren und deshalb nicht mehr zurückreagieren können. Dadurch entfällt die Restitution, und die Radikalkonzentration ist entsprechend größer. Diese sehr schnelle

Reaktion lässt zwar ein relativ reaktionsträges O_2^- -Radikalanion entstehen, das Radikal des Biomoleküls reagiert zusätzlich mit O_2 zum Peroxidradikal, was ebenfalls die Restitution verhindert (=Sauerstoffeffekt):



Die direkte Strahlenwirkung beschreibt die Auswirkung der direkten Wechselwirkung Molekül - Strahlung. Die Ausbeute direkter Strahlenschäden hängt daher nur von der Strahlendosis und nicht von der Konzentration der Zielmoleküle ab. Während bei Bestrahlung von DNS in Lösung die Schäden stark überwiegen, die auf indirekte Strahlenwirkung zurückzuführen sind, können direkte Strahlenschäden bei Bestrahlung von lebenden Zellen beobachtet werden. So treten nach in vivo-Bestrahlung Doppelstrangbrüche der DNS-Helix auf, die eine lineare Dosis-Abhängigkeit zeigen, da sie auf ein einziges Trefferereignis zurückzugehen scheinen (Kiefer 1981, Frankenberg-Schwager et al. 1980). Das Verhältnis zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen nach intrazellulärer Strahlen-Exposition der DNS liegt, je nach biologischem System, zwischen 10:1 bis 20:1 (Kiefer 1981).

In vitro-Bestrahlung von doppelsträngiger DNS mit ionisierenden Strahlen führt zunächst zu einer dosisabhängigen Absorptionserhöhung bei 265 nm, die einer strahleninduzierten Denaturierung zugeschrieben wird. Bei weiterer Dosiserhöhung tritt eine fortschreitende Abnahme der Absorption ein, die auf Basenschädigungen zurückgeführt wird (Kiefer 1981). Zwar ist über die Strahlenchemie der DNS-Basen relativ viel bekannt und eine Vielzahl von Produkten beschrieben worden, doch weiß man wenig über ihre biologische Bedeutung, was neben der Schwierigkeit der Zuordnung primärer Schaden - biologischer Effekt unter einer Vielzahl von Schäden (Ward 1986) auch am Fehlen sensitiver experimenteller Methoden für den Nachweis dieser Basenschäden liegt (Hagen 1986). Es gibt Hinweise auf einzelne Basenschäden (single damage) sowie auf die Existenz von einer Anhäufung mehrerer strahlengeschädigter Basen, vermutlich erzeugt durch direkte Strahlenwirkung. Hierbei wird die DNS-Struktur unter anderem dahingehend verändert, daß sie die Stabilität der Wasserstoffbrücken zwischen der Doppelhelix reduziert, und damit eine lokale Denaturierung entsteht (Martin-Bertram 1983).

Doppel- und Einzelstrangbrüche werden von der Zelle nicht toleriert. Ihr Verbleiben in der DNS führt zum Tode der Zelle (Painter et al. 1974; Duggle et al 1976; Frankenberg et al. 1981 und 1978). Zusätzlich häufen sich experimentelle Hinweise, daß es sich bei DNS-Doppelstrangbrüchen um die Primärläsionen handelt, die zu Chromosomenaberrationen führen (Natarajan und Obe 1978, 1984; Natarajan et al. 1980; Bryant 1984). Chromosomenaberrationen stehen im Verdacht, Zelltransformation (Bavern 1914; Cairns 1981; Klein 1981; Barendsen und Gaiser 1985) und Zelltod zu bewirken (Grote 1971; Dewey et al 1970; Carrano 1973; Joshi et al 1982).

In diese Vorstellungen sind jedoch die biologischen Auswirkungen von Basenschäden infolge mangelnder experimenteller Daten nicht mit eingegangen. Sie haben jedoch ebenso eine erhebliche Bedeutung für das Überleben der Zelle, da für die zentrale Funktion der DNS in der Zelle nicht nur ihre mechanische, sondern auch die genetische Integrität erforderlich ist. Sind nämlich die Bausteine für den genetischen Code, die Basen, geschädigt, so ist eine korrekte und sinnvolle Informationsweitergabe nicht mehr gewährleistet. Letale Wirkung für die Zelle wird nicht einzelnen geschädigten Basen zugeschrieben, sondern Anhäufungen von geschädigten, veränderten Basen, den sog. "Locally Multiply Damaged Sites" (LMDS; Ward 1986a und b). Diese LMDS bestehen nach neuesten Untersuchungen (Ward 1985) nur zum kleineren Teil aus Doppelstrangbrüchen. Im Vergleich zu Doppelstrangbrüchen treten 2,7 mal häufiger solche LMDS auf, die aus einem Einzelstrangbruch und einer geschädigten Base bestehen und 7,3 mal so oft LMDS, die 2 geschädigte Basen enthalten. Die alleinige Messung von Doppelstrangbrüchen erfaßt nach dieser Berechnung nur 10 % aller strahleninduzierten LMDS (Ward 1985).

Ein Überleben von Organismen und eine Konservierung der Erbinformation ist nur möglich, weil jede Zelle über Reparaturmechanismen für DNS-Läsionen verfügt. Die Wege, die eine Zelle zur Verfügung hat, um strahleninduzierte DNS-Schäden zu beheben, sollen im folgenden kurz skizziert werden (Friedberg 1985; Hanawalt et al. 1979; Haynes und Kunz 1981).



Bestimmte Strahlenschäden können direkt durch Umkehrung der zum Schaden führenden biochemischen Reaktion repariert werden katalysiert durch Enzyme, wie z. B. Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere durch das photoreaktivierende Enzym (Iwatsuki et al. 1980; Sancar und Sancar 1984; Sutherland 1981), die Entfernung von Methyl- und Ethylgruppen durch

die O⁶-Methylguanin-DNS-Methyl-Transferase (Karran et al. 1979; Olsson und Lindahl 1980; Lindahl et al. 1982; Foots et al. 1980; Demple und Karran 1983; Yarosh 1985; Sedgwick 1986) oder Einzelstrangbrüche eines bestimmten Typs durch die Polynucleotid-Ligase (Jacobs et al. 1972; Friedberg 1983).

Modifizierte oder beschädigte Basen in der DNS können als freie Basen, Nukleotide oder Oligonukleotide durch Exzisions-Reparatur entfernt werden. Die geschädigten oder veränderten Basen werden dabei erkannt, entfernt und ersetzt, um die Integrität des Codes der DNS wiederherzustellen. Entsprechend gibt es eine Vielzahl von Enzymen, die an dieser Art von Reparatur beteiligt sind, wie DNS-Glycosylasen (Lindahl 1982; Friedberg 1984; Sedgwick 1986; Haseltine et al. 1980; Radany und Friedberg 1980; Nakabeppu und Sekiguchi 1981; Katcher und Wallace 1983), AP-Endonucleasen (Friedberg et al. 1981; Lindahl 1982; Friedberg 1985), Gamma-Endonuclease (Pawl et al. 1976; Friedberg 1985; Hentosh et al. 1985; Schäfer et al. 1980; Wallace 1985; Kow und Wallace 1985; Waldstein et al. 1979), die jeweils unterschiedliche Arten von Basenschäden erkennen und unterschiedliche Wirkungsweisen zeigen, ebenso Exonuklease (Friedberg und Lehman 1974; Sedgwick 1986; Friedberg 1984 und 1985), DNA-Polymerasen (Friedberg 1984) und Ligasen.

Auch die Reparatur von Einzelstrangbrüchen mit geschädigten Endgruppen geht über die Exzisionsreparatur.

Sind beide DNS-Stränge geschädigt, so beschreitet die Zelle einen Reparaturweg, bei dem der intakte Strang vom homologen Schwester- oder Tochterchromosom als Matrize für die DNA-Synthese verwendet wird (Friedberg 1984; Sedgwick 1986). Dies kann über einen Rekombinationsmechanismus ablaufen: ein intakter homologer Strang wird transferiert, um die Lücke zu schließen, die zunächst bei der Replikation an der Schadensstelle entstand, weil die Polymerase über diese "hinweglief". Eine solche Lücke kann auch präreplikativ durch Exzision geschädigter Basen

z.B. von Interstrang-Crosslinks entstehen, die dann durch Rekombinationsaustausch mit einer homologen Doppelhelix repariert wird, gefolgt von Exzision der Läsion und Reparatursynthese (Friedberg 1984; Sedgwick 1986).

Auch Doppelstrangbruchreparatur hängt, zumindest in *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae*, von der Interaktion mit einer homologen DNS-Doppelhelix ab. Reparatur derartiger Schäden setzt Profizienz in homologer Rekombination voraus (Sedgwick 1986; Szostak et al. 1983).

In verschiedenen Organismen konnte, genetisch und/oder biochemisch, ein induzierbarer Reparaturmechanismus nachgewiesen werden (Baker 1983; Lee und Yarranton 1982; Lee 1983; Holliday 1975; Schorpp et al. 1984; Hagedorn et al. 1983; Dambrosio und Setlow 1976 und 1978; Friedberg 1984), den man im Falle von *E. coli* "SOS-Reparatur" nannte, und der zu einer erhöhten Mutationsrate führte (Little und Mount 1982; Lindahl 1982; Walker 1984; Friedberg 1984; Sedgwick 1986). Die Entfernung von Schäden, die der Zelle über einen Replikationsstopp gefährlich werden könnten, hat dabei Vorrang vor der Genauigkeit der Polymerase, weshalb eine höhere Fehlerrate in Kauf genommen wird ("error prone repair").

Der einzellige, eukaryotische Organismus *Saccharomyces cerevisiae* ist schon lange Zeit Gegenstand derartiger Reparaturuntersuchungen. Die Hefe verbindet die Vorteile prokaryotischer Zellen für Laboranalysen, vor allem die kurze Generationszeit von ungefähr 2 Stunden, mit dem Vorteil eukaryotischer Gen- und Chromatinorganisation (Reevers 1984), die einen entscheidenden Einfluß auf die Schadenssetzung hat und vorsichtige Rückschlüsse auf Sachverhalte beim Menschen erlaubt.

Die Bildung von DNS-Strangbrüchen in Säuerzellen, sowohl von Einzel- als auch Doppelstrangbrüchen, besonders aber die Schädigung von Nukleotidbasen, ist beeinflusst von der Chromatinstruktur, wenn es sich beim schädigenden Agens

um ionisierende Strahlung handelt, wie es schon für andere Agentien auch beschrieben worden ist (Hagen 1986; Oleinick et al. 1983).

Da die Chromatinstruktur eine große Rolle in der Regulation der Transkription und Replikation eukaryotischer DNS spielt, ist es wahrscheinlich, daß sie auch einen wichtigen Faktor bei DNS-Reparaturprozessen darstellt (Reeves 1984). Die Zugänglichkeit von Schadensstellen in der DNS für Reparatursysteme wird offensichtlich primär von ihren Positionen im Chromatin beeinflußt (van Zeeland et al. 1981). DNS in naszierendem Chromatin erwies sich als dreimal sensitiver in Bezug auf die Häufigkeit strahlen-induzierter Thymin-Schäden als reife Chromatin-DNS. Naszierende DNS wird in gleichem Maße resistenter, wie der DNS-Reifungsprozeß voranschreitet. Dies weist darauf hin, daß es die Packung der DNS im Chromatin ist, die die Sensitivität der DNS gegenüber Basenschäden bestimmt (Warters und Childers 1982; Cerutti 1976).

Betrachtet man die Reparatureffizienz von einer höheren Organisationsstufe aus, so scheinen Genombereiche mehr oder weniger für Reparatursysteme zugänglich zu sein, abhängig von ihrem Expressionszustand oder ihrer Funktion in der Zelle (Bohr und Hanawalt 1984). Schließlich wird eine Kaskade von Reparaturreaktionen erst als beendet angesehen werden können, wenn die ursprüngliche Chromatinstruktur an der Schadensstelle wiederhergestellt ist.

Grundlegende Untersuchungen an Modellsystemen wie der Hefe, die diese komplexen Fragestellungen in Hinblick auf Mechanismen der Antimutagenese und Anticarcinogenese beim Menschen erhellen sollen, sind unverzichtbar.

Es sind mindestens 95 Mutationen im Hefe-Genom beschrieben, die die Resistenz der Zellen gegenüber bestimmten Chemikalien und/oder Strahlung beeinflussen (Haynes und Kunz 1981; Kunz und Haynes 1981; Lawrence 1981; Game 1983). Die Kombination mehrerer solcher mutierter Loci in einer Mutante führte zur Aufstellung eines komplexen Systems für die Reparatur von Strahlenschäden in der

Hefe. Doppelmutanten, die nicht sensibler sind als die Einfachmutante, erlauben die Zuordnung beider Gene zu einer Epistasisgruppe. Man erklärt den epistatischen Effekt damit, daß die beiden mutierten Gene an der Kontrolle desselben Reparaturweges beteiligt sind (Cox und Game 1974).

Auf der Basis dieser Klassifizierung der Doppelmutanten wurden drei DNS-Reparaturwege für *Saccharomyces cerevisiae* postuliert. Die drei Gruppen tragen jeweils den Namen eines prominenten Mitglieds und sind als Übersicht bei Haynes und Kunz 1981 besprochen.

RAD3-Gruppe

Hefezellen können Pyrimidindimere sowie eine große Anzahl anderer Schäden, die zu starken Konformationsänderungen der DNS führen, aus ihrer DNS nach UV-Bestrahlung entfernen (Unrau et al 1971; Waters und Moustacchi 1974; Prakash 1975). Mutationen in mindestens 11 Loci (*rad1*, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 16, 23, *mms19* und *cdc9*; Game und Cox 1971; Prakash und Prakash 1977; Cox und Game 1974; Haynes und Kunz 1981; Kunz und Haynes 1981; Lawrence 1982; Game 1983) beeinträchtigen diesen Prozeß.

Vertreter der RAD3-Gruppe sind sensitiv gegenüber UV und zeigen erhöhte UV-induzierte Mutagenese (Kunz und Haynes 1981). Exzisionsdefekte Mutanten sind auch gegenüber anderen Agentien sensitiv und antworten mit erhöhter Mutagenese. Die zur RAD3-Epistasisgruppe zählenden Mutanten zeigen annähernd Wildtyp-Verhalten gegenüber den letalen und mutagenen Effekten ionisierender Strahlung und einiger monofunktionell alkylierender Agentien (Lawrence 1982).

Die *rad1*-, *rad2*-, *rad3*-, *rad4*- und *rad10*-Mutanten erwiesen sich als defekt in der Inzision oder den Präinzisionsschritten der Exzisionsreparatur (Wilcox und Prakash 1981; Reynolds und Friedberg 1981), nicht hingegen *rad16*

und rad14-Mutanten (Wilcox und Prakash 1981). Zellen, die Defekte im CDC9-Gen aufweisen, dem Gen für die DNS-Ligase (Johnston und Naysmyth 1978), zusätzlich zu Mutationen in den Genen RAD16 und RAD14, sind zum DNS-Inzisions-schritt befähigt. Dieser ist für die Entfernung von Pyrimidindimeren in der DNS nach UV-Bestrahlung nötig (Wilcox und Prakash 1981).

rad1,2,3,4,7,10,14 und rad16 katalysieren die Exzision von Dimeren in UV-bestrahlter DNS in vitro, die nach Bestrahlung mit *Micrococcus luteus*-Endonuclease behandelt worden war (Reynolds et al. 1981). Inzision der DNS an Pyrimidindimeren, die durch UV-Bestrahlung der DNS in Lösung entstanden waren, wird in Extrakten von rad1-, 2-, 3-, 4-, 10- und rad16-Zellen festgestellt (Bekker et al. 1980). Auch Extrakte von rad1-, 2-, 3- und rad4-Zellen katalysieren die Exzision von Pyrimidin-Dimeren in UV-bestrahlter DNS ohne vorherige enzymatische Inzision (Bekker et al. 1984). Diese Experimente reflektieren also nicht die in vivo-Situation, was auf die Unterschiede zwischen nackter DNS und Chromatin in Bezug auf Schadenssetzung und Reparatur zurückgeführt wird (Bekker et al. 1984; Friedberg 1984).

RAD1, 2, 3, 4 und RAD10 sind kloniert worden (Naumovski und Friedberg 1982, 1983, 1984; Friedberg et al. 1983; Higgins et al. 1983; Yang und Friedberg 1984; Fleer et al. 1987; Siede und Eckardt 1986)

Das RAD3-Genprodukt, das für die Zelle essentiell ist (Deletionen im RAD3-Gen sind rezessiv lethal; Higgins et al. 1983), zeigt DNS-abhängige ATPase- und DNS-Entwindungsaktivität und stimuliert die Aktivität der Hefe DNS-Polymerase I in vitro (Sugino und Sugino 1984).

RAD52-Gruppe

Mitglieder dieser Gruppe zeigen erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen (Haynes und Kunz 1981). Am sensibelsten zeigen sich rad51-, rad52- und rad54-Zellen. Sie sind in der induzierten sowohl als auch in der spontanen mitotischen Rekombination gestört (Saeki et al. 1980). rad52- und rad54-Mutanten sind unfähig zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die von ionisierenden Strahlen induziert wurden (Ho 1975; Resnick und Martin 1976; Budd und Mortimer 1982). Andere Mutanten dieser Gruppe, so rad50, rad53, rad55, rad56 und rad57 zeigen eine geringere Radiosensitivität und beschränkte Rekombinationsfähigkeit (Game 1983).

Die zu RAD52 epistatischen Gene scheinen in einem DNS-Reparatur-Mechanismus eine Rolle zu spielen, der über einen Austausch mit einer homologen Doppelhelix via homologe mitotische Rekombination abläuft (Game 1983; Kunz und Haynes 1981). Die Gene RAD52 (Schild et al. 1983; Adzuma et al. 1984) und RAD50, 51, 54 und RAD55 (Calderon et al. 1983) wurden kloniert. In rad52-Mutanten wurde das Fehlen einer Einzelstrang-Nuclease-Aktivität festgestellt (Chow und Resnick 1983; Resnick et al. 1984). Diese Defizienz in RAD52-defekten Mutanten wird dahingehend interpretiert, daß Einzelstrangbrüche während der Rekombination durch das RAD52-Genprodukt prozessiert werden.

RAD6-Gruppe

Mutationen in 17 verschiedenen Loci verursachen eine Reduktion der induzierten Mutationsinduktion (Lawrence 1982; Lawrence et al. 1985a und b). Im Vergleich zum Wildtyp weisen die zur rad6-Mutante epistatischen Mutanten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV, ionisierenden Strahlen und mono- und bifunktionellen Alkylantien auf (Game 1983; Haynes und Kunz 1981). Mit Ausnahme von

rad6 und rad18 zeigen die Mutanten, die zu dieser Gruppe gehören, eine geringere UV-Sensitivität als exzisionsdefekte Stämme.

rad6-1, rad9-1 und rad18-1-Mutanten verfügen über die Aktivität zur Exzisionsreparatur (Prakash 1977; Reynolds und Friedberg 1981). Die komplexen und heterogenen Phänotypen der Mutanten dieser Gruppe sprechen dafür, daß sich sowohl mutagene als auch nicht-mutagene Reparaturprozesse unter der Kontrolle von RAD6 befinden (Lawrence et al. 1985a und b; Game 1983; Haynes und Kunz 1981; Prakash 1981; Siede und Eckardt 1984). Direkte biochemische Evidenzen für den Mechanismus dieses mutagenen Reparaturprozesses ("error prone repair") stehen noch aus.

Homozygote rad6-1-Diploide sind nicht zur Sporulation fähig (Cox und Parry 1968) als Ergebnis ihres Defektes in der Ausbildung von Spindeln in der meiotischen Metaphase I (Kundu und Mcens 1982).

Die Gene RAD6 (Kupiec und Simchen 1984), REV3 (Lemontt et al. 1982) und REV2 (Siede et al. 1986) wurden kloniert.

Die verzweigten Reparaturwege der Hefe sprechen für die Komplexität der Kontrolle der DNS-Reparaturmechanismen und lassen vermuten, daß in Säugetierzellen eine ähnlich komplexe Situation anzutreffen ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Induktion von gamma-induzierten Basenschäden in eukaryotischem Chromatin zu untersuchen sowie deren Reparierbarkeit. Als Modellorganismus wurde *Saccharomyces cerevisiae* gewählt, weil die Hefe der bezüglich der DNS-Reparatur bestuntersuchte eukaryotische Organismus ist.

Während über die Reparatur einzelner Basenschäden bereits viele Erkenntnisse vorliegen (Friedberg 1984), war

Über die Reparatur geclusterter Basenschäden kaum etwas bekannt. Diese Schäden führen, wie oben erwähnt, zu einer lokalen Denaturierung der beiden Stränge einer Doppelhelix und können mit Hilfe der S1-Nuclease nachgewiesen werden (Martin-Bertram 1981; Martin-Bertram und Hagen 1979; Martin-Bertram et al. 1983b und 1984).

S1-Nuclease aus *Aspergillus oryzae* baut spezifisch einzelsträngige DNS und RNS (Vogt 1973; Ando 1966; Wiegand et al. 1975), Heteroduplex-DNS (Wiegand et al. 1975; Shenk et al 1975) und denaturierte Bereiche komplementärer DNS (Wiegand et al. 1975; Hofstetter et al. 1976) ab. Kleinere Bereiche wie Lücken, die einem Einzelstrang gegenüberliegen, werden nicht erkannt (Dodgson und Wells 1977; Silber und Loeb 1981). Daß das Substrat für die S1-Nuclease tatsächlich eine Anhäufung durch Gamma-Strahlen modifizierter und damit paarungsunfähiger Basen ist, die nach Enzymbehandlung abgebaut sind, wurde durch Schmelzpunktanalysen erbracht (Martin-Bertram et al. 1983 und 1984). Die auf diesen Experimenten basierende Modellvorstellung von der Natur der S1-Nuclease-sensitiven Stellen nach Gamma-Bestrahlung ist im folgenden Schema dargestellt.

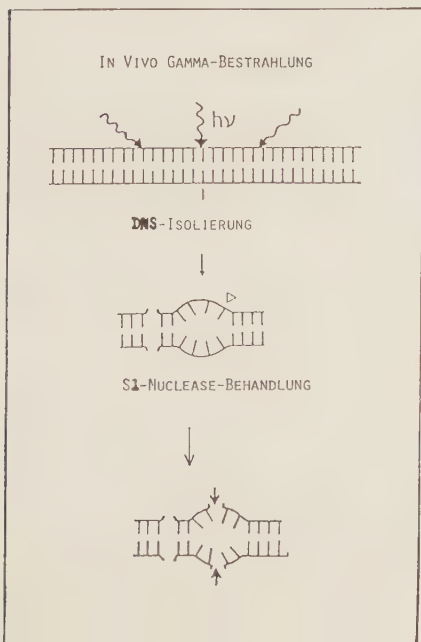


Abb. 1:
Vereinfachtes Schema
der einzelnen Schritte
der S1 Nuclease Be-
handlung von DNS aus
bestrahlten Hefezellen
▷ S1 Nuclease sensi-
tive Stelle (denaturier-
te DNS Region aus min-
destens 3 ungepaarten
Basenpaaren)
→ Doppelstrangbruch
als Folge der S1
Nuclease Reaktion

Die Incision des Enzyms an solchen Läsionen der aus bestrahlten Zellen isolierten DNS führt zu Doppelstrangbrüchen und damit zu DNS-Molekülen geringerer Größe im Vergleich zur unbehandelten DNS (s. Abb. 1).

S1 Nuclease sensitive Stellen wurden bisher in Phagen (Martin-Bertram und Hagen 1979; Martin-Bertram 1981; Martin-Bertram et al. 1983b; Martin-Bertram et al. 1984), in Säugerzellen (Paterson et al. 1976; Paterson et al. 1978; Yoshizawa et al. 1978; Furuno et al. 1979) und im Hefe-Genom (Andrews et al. 1984) gefunden. Es besteht jedoch bisher noch keine Kenntnis über deren Lokalisation im Genom, das Ausmaß der Bereiche gestörter Basenpaare, sowie deren Reparierbarkeit.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich in Teil I mit den methodischen Voraussetzungen zur Bearbeitung dieser Fragestellung und in Teil II mit der Untersuchung S1 Nuclease sensitiver Stellen im endogenen 2µm Plasmid von *Saccharomyces cerevisiae* nach Bestrahlung mit ^{60}Co -Gammastrahlung unter anoxischen Bedingungen und ihrer etwaigen Reparatur. In Teil III wird die Analyse auf das Kerngenom der Hefe ausgeweitet. Gegenstand dieser Untersuchungen ist die Klärung der Bedeutung der DNS-Konformation für das Auftreten von S1 Nuclease sensitiven Stellen nach Gamma-Bestrahlung, die Häufigkeit dieser Basenschäden im Vergleich zu Doppelstrangbrüchen, die Frage nach der Lokalisation der S1 sites im Genom, ihre Quantifizierung und Reparierbarkeit in Hefezellen. Der Sauerstoffausschluß bei Bestrahlung sollte auf Sauerstoffradikale zurückgehende Effekte ausschließen.

Teil I:

VORVERSUCHE UND OPTIMIERUNGEN

1. EINLEITUNG

Die Problematik der Analyse von S1-Nuclease-sensitiven Stellen im Kerngenom, die in Teil II der vorliegenden Arbeit dargestellt ist, lag zunächst in der Wahl einer schonenden Isolierungsmethode von genomischer DNS. Weiter mußte eine geeignete Methode der Strangbruchanalyse gefunden werden, die erlaubt, neben den direkt durch die Bestrahlung erzeugten Doppelstrangbrüchen auch S1-Nuclease-sensitive Stellen zu erkennen. Die verwendete Methode mußte die Umwandlung dieser Regionen in Doppelstrangbrüche erlauben.

1.1. DNS-Isolierungsmethoden

Den vielfältigen bis zum heutigen Tag allgemein angewandten Isolierungsmethoden von Kern-DNS aus Hefezellen sind allen Spheroblastierung und Lyse der Zellen, Proteinverdau, Entproteinisierung mit Phenol und/oder Chloroform, Alkoholfällungen, RNase-Verdau und eventuell Dichteentrifugation und Dialyse gemein. Diese Art der Präparation - Voraussetzung für die Molekulargewichtsanalyse mit Hilfe der Sedimentation in der analytischen Ultrazentrifuge oder der Elektrophorese im konventionellen Agarosegel - führt zu einer starken Degradierung der genomischen DNS. Je höhermolekular die DNS ist, umso stärker wird sie gebrochen. Das bedeutet, daß unbestrahlte DNS im Verhältnis stärker durch die Präparation geschädigt wird als bestrahlte und somit der auf die Bestrahlung zurückgehende Molekulargewichtsunterschied der aus bestrahlten und unbestrahlten Zellen isolierten DNS nivelliert wird. Bestrahlungs- oder S1-Nuclease-induzierte Strangbrüche sind bei einer solch hohen Präparationsbruchrate schwer zu erkennen und machen die Anwendung extrem hoher Be-

strahlungsdosen erforderlich, die sich in einem für Reparaturuntersuchungen ungeeigneten Überlebensbereich bewegen. Der Großteil der in einer Strangbruchanalyse derart isolierter DNS gefundenen Strangbrüche ist eher auf die Präparation als auf Bestrahlung oder SI-Nuclease-Behandlung zurückzuführen.

Die Isolierung von DNS aus Hefezellen in Chromosomengröße ohne Einführung von Strangbrüchen während der Präparation in Verbindung mit Molekulargewichtsbestimmungen ist möglich durch zwei unterschiedliche Methoden.

Einmal werden Hefespheroblasten in eine Detergens-haltige Lysisschicht auf einem neutralen Sucrosegredienten eingebracht und dort lysiert. Die dadurch freigesetzte DNS wird anschließend im Sucroседichtegradienten zentrifugiert. Ihr Sedimentationsverhalten gibt Aufschluß über ihr Molekulargewicht. Diese Methode erlaubt die Untersuchung von Hefe-DNS-Molekülen von einem Molekulargewicht bis zu 10^9 Dalton (1600 kbp) (Resnick und Martin 1976; Frankenberg-Schwager et al. 1979).

Die andere DNS-Isolierungsmethode bettet intakte Hefezellen in Agaroseblöckchen ein, wo sie spheroblastiert und lysiert werden, ohne daß Pipettier-, Präzipitations- oder Zentrifugierschritte nötig wären. Durch Einwirkung von Detergentien und Enzymen auf die Zellen in den Agaroseblöckchen wird die DNS freigesetzt und kann anschließend im Agarosegel elektrischen Wechselfeldern ausgesetzt und in Chromosomengröße aufgetrennt werden (Schwartz und Cantor 1984).

1.2. Methoden der Strangbruchanalyse

1.2.1. Die Sedimentation hochreiner DNS in wässriger, homogener Lösung wird in der analytischen Ultrazentrifuge mit angeschlossenem photoelektrischem Aufzeichnungssystem bei 20-24000 Umdrehungen/Minute verfolgt. Hierbei wird die Sedimentationsfront der DNS zu verschiedenen Zeitpunkten von einem Schreiber aufgezeichnet. Die Aufzeichnungen werden dann manuell und computerunterstützt ausgewertet. Das Ergebnis ist das Gewichtsmittel aus einer Verteilung von Molekülen unterschiedlicher Größe, das auf das numerische Mittel umgerechnet wird (Hagen und Coquerelle 1974). Die obere Auflösungsgrenze dieser exakten Methode der Molekulargewichtsbestimmung liegt bei ungefähr 4×10^8 Dalton (600 kbp), während schon das kleinste der 16 Hefechromosomen ein Molekulargewicht von $1,65 \times 10^8$ Dalton (250 kbp) hat. Man kann bei Anwendung dieser Technik die oben beschriebene bruchinduzierende DNS-Präparationsmethode nicht umgehen, da nur sie den erforderlichen Reinheitsgrad der DNS durch Cäsiumchloriddichtesedimentation liefert. Außerdem ermöglicht diese Art der Präparation erst die Analyse in der Analytischen Ultrazentrifuge mit einer oberen Auflösungsgrenze von ungefähr 50 kbp, indem sie das Molekulargewicht der hochmolekularen chromosomalen DNS der Hefe (mit einer durchschnittlichen Größe von 750 kbp) durch Bruchinduktion auf etwa 50 kbp verringert und damit eine Größenhomogenisierung der Moleküle bis zur Zufallsverteilung der Kettenlängen bewirkt.

1.2.2. Zentrifugation eines neutralen Sucrosegradienten, der von einer Spheroblasten-enthaltenden Lysisschicht überschichtet ist (bei niedriger Geschwindigkeit zur Vermeidung von Geschwindigkeitseffekten, die zu Brüchen führen können), ermöglicht die Abtrennung von Proteinen, Lipiden, RNS und Membranpartikeln von der DNS, ohne daß Brüche induziert werden. Die Auswertung des Sedimentationsprofiles der radioaktiv markierten DNS-Population

in einem solchen Gradienten erlaubt die Bestimmung ihres mittleren Molekulargewichtes. Möglich ist die Identifizierung eines einzigen Doppelstrangbruches pro Kerngenom der Hefe (Frankenberg-Schwager et al. 1979).

1.2.3. Die konventionelle Agarosegelelektrophorese erlaubt die Auftrennung heterogener Molekülpopulationen der Größe bis 50 kbp. Eine brauchbare Auflösung nimmt oberhalb dieses Molekulargewichtsbereiches drastisch ab. Größere DNS-Moleküle zeigen anomal hohe gelelektrophoretische Mobilitäten (Fangman 1978) selbst in extrem schwachen Matrices sehr niederprozentiger Agarosegele und können daher nicht mehr aufgetrennt werden.

1.2.4. DNS-Molekülgemische der Größenordnung von Hefe-Chromosomen konnten erfolgreich aufgelöst werden durch Störung ihrer Orientierung und Ausdehnung in Agarosegelmatrices (Schwartz und Cantor 1984).

Schwartz und Cantor knüpften mit diesen Versuchen an Experimente mit Hilfe der Viskoelastizitätstechnik (Klotz und Zimm 1972) an. Hierbei wurden DNS-Moleküle in freier Lösung aus ihrer normalen, zufälligen, geknäuelten Konfiguration gestreckt, woraufhin sie sich wieder entspannen konnten. Zwar ist die gemessene Relaxationszeit der DNS in diesen Viskoelastizitätsuntersuchungen sehr eng mit ihrem Molekulargewicht korreliert, die Methode eignet sich aber nicht zur Separierung von Molekülen.

Setzt man jedoch DNS aus in Agarose lysierten Zellen im Agarosegel alternierend gepulsten, senkrecht aufeinander stehenden, inhomogenen elektrischen Feldern aus, so werden DNS-Moleküle, wie sie in Hefe-Chromosomen vorkommen, in eine Anzahl gespreizter, räumlich voneinander getrennter Banden aufgelöst (Carle und Olson 1984 und 1985).

Die Größen der kleineren dieser Moleküle wurden abgeschätzt, indem man ihre Mobilitäten mit jenen einer Reihe von Größenstandards verglich, die den Bereich bis 750 kbp abdeckte.

Die elektrophoretische Mobilität der DNS in dieser orthogonalen Wechselfeldelektrophorese (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis, genannt OFAGE; Carle und Olson 1984 und 1985) hängt streng von der Pulszeit, d.h. der Dauer des angelegten Feldes, ab. Ist die Reorientierungszeit der Moleküle vergleichbar mit der Rate des Feldwechsels, verweilt das Molekül die meiste Zeit in einer Orientierung, die eine kleine Netto-Mobilität erlaubt. Die Pulsfrequenz, die diese Minimal-Mobilität bewirkt, ist im wesentlichen eine Resonanzfrequenz, die vom Molekulargewicht abhängt (Carle und Olson 1984). Von ebenso großem Einfluß auf die gelelektrophoretische Mobilität der DNS wie die Pulsfrequenz ist die Natur des elektrischen Feldes. Ein inhomogenes Feld bewirkt eine Schärfung der Banden durch eine Abnahme der Feldstärke in der Migrationsrichtung (Carle und Olson 1984). Die relative Bandenintensität steigt mit zunehmendem Molekulargewicht (Carle und Olson 1984). Die Schärfe der diskreten Banden und ihrer Hybridisierungssignale mit Klonen einzelner Hefegene spricht für eine Ansammlung hochmolekularer DNS-Moleküle einheitlicher Spezies (Carle und Olson 1984 und 1985). Die Größen-Mobilitäts-Beziehungen in den Gelen ähneln nicht einmal qualitativ denen konventioneller Nukleinsäure- und Proteingele. Die Kalibrierungskurven für diese Gele sind über einen großen Bereich annähernd linear (Carle und Olson 1984).

Auftrennung von in Agaroseblöcken lysierten Hefezellen im OFA-Gel lieferte 12 Banden, die durch Hybridisierungsexperimente mit Chromosomenproben als 9 Einzel- und 3 komigrierende Doppelbanden identifiziert werden konnten, die den Chromosomen I-XI und XIII-XVI entsprechen (Carle und Olson 1984). Mit Ausnahme dieser drei Doppelbanden nehmen die Intensitäten der Banden mit der offensichtlichen Größe regulär zu, was den Schluß zuläßt, daß die Chromosomen in äquimolaren Mengen vorhanden sind. Man fand aber auch Hefe-Laborstämme, deren Chromosomen-Längenpolymorphismus eine Auftrennung in 15

Einzelbanden ermöglichte. Der Chromosomen-Längenpolymorphismus wird auf eine stammbabhängige Variabilität von Tyl repetitiven Elementen und einen ausgeprägten Polymorphismus der Telomer-angrenzenden Sequenzen zurückgeführt (Carle und Olson 1985).

Chromosom XII, das den rRNS-Genblock trägt, läuft als einziges Chromosom nicht in das Gel ein, sondern wird in der Geltasche immobilisiert, was man auf präparationsbedingte Assoziation des Chromosoms mit zellulären Komponenten, vielleicht dem Nucleolus, oder die hohe Kopienzahl der rRNS-Gene zurückführt (Carle und Olson 1985). Die mitochondriale DNS läuft als breiter Schmier unterhalb der 1. Chromosomen-Bande (Carle und Olson 1985). Die Killer-RNS zeigt eine noch größere Migrationsgeschwindigkeit und ist als relativ scharfe Bande unterhalb des Mitochondrien-Schmiers zu sehen (Carle und Olson 1984).

Es besteht eine generell gute Korrelation zwischen der physikalischen, mit Hilfe der OFAGE bestimmten, und der genetischen, mit Hilfe von meiotischen Kopplungskarten bestimmten Größe der Chromosomen. Für die vier Chromosomen I, VI, III und V, für die sowohl physikalische als auch genetische Größenabschätzungen verfügbar sind, variiert das Verhältnis zwischen den beiden Werten nur um etwa 2,5 kb/centiMorgan. Diese neue Technik kann daher auch zur Bestimmung von Karyotypen eingesetzt werden (Carle und Olson 1985).

Die im Vorangegangenen beschriebenen Methoden wurden vor Aufnahme der eigentlichen Untersuchungen auf ihre Tauglichkeit bei der Bearbeitung der gestellten Thematik getestet.

1.3. Allgemeine Optimierung der S1-Reaktion

Um eine strahleninduzierte Läsion untersuchen zu können, die durch eine anschließende enzymatische Reaktion in Form von Doppelstrangbrüchen sichtbar wird, muß zunächst die Aktivität des Enzyms exakt definiert und reproduzierbar sein. Es war daher eine Optimierung der S1 Nuclease-Aktivität und -Spezifität erforderlich. Hierzu zählen die unter 2.2. aufgeführten Optimierungen der Reaktions-Bedingungen für den S1 Nuclease-Verdau, die eine Enzymaktivität an einem Einzelstrangbruch ausschließen mußten (s. 2.2.1. und 2.2.2.).

Als nächstes mußte die Substratspezifität der S1-Nuclease durch in vitro-Untersuchung von Heteroduplices geklärt werden. Diese wurden mittels in vitro-Hybridisierung von M13mp-DNS, die sich in den Nukleotiden eines spezifischen Codons unterschieden, hergestellt (Kramer et al. 1984).

Mit diesem Ansatz wurden folgende Fragen angegangen: Erkennt die S1 Nuclease Fehlpaarungen eines Basenpaares oder wird erst eine Fehlpaarung größeren Ausmaßes erkannt? Werden nur Fehlpaarungen eines bestimmten Typs geschnitten, und bevorzugt die S1 Nuclease hierbei Transitionen oder Transversionen (s. 2.3.)?

1.4. Untersuchungen zur S1 Aktivität in Agarose

Die Analyse von S1-Nuclease-sensitiven Stellen in den Chromosomen mit Hilfe der OFAGE setzte die Präparation der DNS in Agaroseblöcken voraus. Daher mußten Bedingungen für die S1-Nuclease-Reaktion in Agarose ausgearbeitet werden.

Da die Lyse der Zellen mit Hilfe von Proteinase K erfolgte, mußte davon ausgegangen werden, daß die Sl-Nuclease von ihr zerstört werden könnte. Es wurde daher ein Inhibitor der Proteinase K eingesetzt, nämlich Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).

Zunächst mußte die optimale Konzentration für den Inhibitor PMSF ermittelt werden, was mit Hilfe eines Maltase-Aktivitäts-Tests geschah (s. 2.4.1.).

Nach Einsatz dieser optimalen PMSF-Konzentration wurde an partiell hitzedenaturierter Hefe-DNS (s. 2.4.2.) in Agarose die Enzymkonzentration ausgetestet, die zur Degradierung denaturierter DNS durch die Nuclease Sl führt, dabei doppelsträngige DNS nicht (s. 2.4.3.), einzelsträngige DNS jedoch vollkommen abbaut (s. 2.4.4.).

Ein wichtiger Test untersuchte die Wirkung des Proteinase K-Inhibitors PMSF auf den Sl-Verdau verschiedener DNS-Spezies in Agarose (s. 2.4.5., 2.4.6., 2.4.7.).

Die Vollständigkeit und Genauigkeit des Sl-Verdaus bei den in Teil III durchgeführten Untersuchungen von Sl-sites im OFA-Gel wurden immer von einem Kontrollexperiment begleitet, bei dem einzelsträngige M13-DNS und doppelsträngige PlasmidDNS im Sl-Lysat-Ansatz mit inkubiert wurde (2.4.8.).

1.5. Reproduzierbarkeit der Lysat-Herstellung

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Lysat-Herstellung wurden Zellen desselben Hefestammes gleichartig zu Agaroselysaten verarbeitet, in OFA-Gelen aufgetrennt und die Intensitäten der einzelnen Banden in den beiden Gelspuren verglichen. Eine Quantifizierung von Sl-Nuclease- und/oder strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen über die Bandenintensität ist nur möglich, wenn Lysatherstellung und Auftrennung im Gel keine größeren Fehlerquellen darstellen (2.5.).

2. ERGEBNISSE

2.1. Vorversuche und Optimierungen

Zunächst wurden die in der Einleitung beschriebenen Untersuchungsmethoden getestet.

2.1.1. Analytische Ultrazentrifugation

Die Bestimmung der Molekulargewichte der sowohl aus unbestrahlten als auch bestrahlten Zellen mit Hilfe der in 2.6. Teil I dargestellten DNS-Isolierungs- und Aufreinigungstechniken gewonnenen DNS in der analytischen Ultrazentrifuge zeigte eine derart hohe Schwankungsbreite der berechneten Molekulargewichte, daß etwaige auf Bestrahlung zurückgehende, sich nach SI-Behandlung als Doppelstrangbrüche manifestierenden SI-Nuclease-sensitiven Stellen im präparationsbedingt hohen allgemeinen Strangbruchhintergrund untergingen, der von Präparation zu Präparation und von Zentrifugation zu Zentrifugation stark variierte. Ein dosisabhängiger SI-Effekt konnte nicht festgestellt werden. Diese Technik schien für die Bearbeitung der gestellten Thematik daher nicht geeignet.

2.1.2. Konventionelle Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von unbestrahlten und in vivo bestrahlten DNS-Proben im konventionellen Agarosegel ließ erkennen, daß die unbestrahlten Proben durch Präparation tatsächlich so stark degradiert waren, daß sie sich von einer mit 2000 Gy bestrahlten Probe nicht mehr unterscheiden ließen. Sichtbar wurde außerdem, daß die DNS-Moleküle dieses Molekulargewichtsbereiches sich in der konventionellen Agarosegelelektrophorese tatsächlich mit größenunabhängiger Mobilität bewegen und daher das infolge von Bestrahlung und SI-Nuclease-Behandlung zu

erwartende heterogene Molekülgemisch nicht in erforderlichem Maße separiert werden konnte. DNS aus unbestrahlten sowie bestrahlten Zellen bandierte auf selber Höhe. Der auf Strangbrüche zurückzuführende niedermolekulare Schmier unterhalb der Hauptbande bestrahlter Proben unterschied sich in Länge und Ausmaß von dem unbestrahlter Proben erst bei Bestrahlungsdosen von 3000 Gy und mehr.

Konventionelle Agarosegelelektrophorese und analytische Ultrazentrifugation schieden daher als Methoden zur Durchführung der erforderlichen Experimente aus, weil sie nur bei Molekülgrößen bis 50 kbp erfolgreich angewandt werden können.

- 2.1.3. Obwohl die Sedimentation der DNS im Sucrose-Gradienten auf den ersten Blick als geeignete Untersuchungsmethode erschien, stellte sich heraus, daß sie mit einer Sl-Nuclease-Behandlung unvereinbar war bzw. diese die Vorteile der Methode zunichte machen würde. Zur Durchführung der Sl-Behandlung wurde zuerst an einen zwischen zwei Sucrose-Zentrifugationen stattzufindenden Sl-Verdau nach einer Dialyse der DNS gedacht. Diese Behandlung würde jedoch wiederum zu einer DNS-Degradierung führen. Als zweite Möglichkeit bot sich ein Sl-Verdau mit permeabilisierten Zellen an, deren DNS sodann im Sucrose-Gradient aufgetrennt würde. Abgesehen von der Unkenntnis darüber, ob die Sl-Nuclease in den Zellkern eindringen und dort aktiv werden kann, würden mit diesem Vorgehen sog. Sl-Nuclease-hypersensitive Stellen im noch intakten Chromatin untersucht werden (Weintraub 1980), die jedoch völlig unterschiedliche Natur als geschädigte, und daher denaturierte, für die Sl-Nuclease zugängliche Bereiche in proteinfreier DNS zeigen. Als letzter Ausweg bliebe eine Sl-Puffer und Sl-Nuclease enthaltende "Sl-Schicht" im Sucrose-Gradienten, die so groß ist, daß die DNS während des Laufs dort die definierte Verweildauer hat, die einen erfolgreichen Sl-Verdau ermöglicht.

Es ist jedoch physikochemisch nicht möglich, eine Schicht des sauren pH-Werts von 4,5 - dem pH-Optimum der SI-Nuclease - in einen neutralen Gradienten einzubringen. Daher ließ sich die Fragestellung auch mit dieser Technik nicht angehen.

2.1.4. Orthogonale Wechselfeldgelelektrophorese (OFAGE)

Es wurde DNS aus verschiedenen bestrahlten Zellen in der OFAGE aufgetrennt (Abb. 2 und 4) und die Negative der Gelphotos densitometrisch ausgemessen (Abb. 3 und 5), indem jede Gelspur mit dem Laserstrahl dreimal abgefahren wurde. Es wurde folgender Auswertungsmodus der Densitogramme entwickelt:

Die relativen Flächenanteile der einzelnen Peaks, die den einzelnen Banden im Gel entsprechen, bezogen auf die Gesamtfläche der Kurve im Densitogramm wurden teils automatisch vom Laser-Densitometer, teils planimetrisch bestimmt. Der relative Anteil jeder Bande einer mit einer bestimmten Dosis bestrahlten und im Gel aufgetrennten Probe an der DNS-Gesamtmenge pro Gelspur, der sich aus den Mittelwerten der jeweiligen Peaks von 3 Densitogrammen pro Bestrahlungsdosis ergab, wurde ins Verhältnis zum Mittelwert der vergleichbaren Peaks im Densitogramm (=Bande im Gel) der unbestrahlten Proben gesetzt. Aus den so erhaltenen Quotienten ließ sich die Bruchrate/Molekül berechnen.

Gemessen wurde der Anteil der verbleibenden ungeschädigten und daher scharf bandierenden DNS-Moleküle. Die densitometrische Auswertung bestätigte, was auf dem ethidiumbromidgefärbten Gel schon sichtbar wurde. Die Intensität der einzelnen Banden nahm mit zunehmender Bestrahlungsdosis linear ab, der niedermolekulare DNS-Schmier im unteren Gelbereich dagegen zu. Bei einer Bestrahlungsdosis von 3888 Gy ist die gesamte genomische DNS durch gammastrahleninduzierte Doppelstrangbrüche degradiert. Es ist nur noch ein Schmier im unteren Gelbereich

erkennbar, der auf Molekülbruchstücke zurückzuführen ist.

Als unabhängiger Größenstandard lief im Gel eine sog. Lambda-Ladder mit. Hierbei handelt es sich um Lambda-DNS, die in entsprechendem Puffer bei 55°C spontan über die cos-Enden zu Oligomeren ligiert. Diese Multimere werden in der OFAGE in Einzelbanden mit einem Abstand von je 50 kbp aufgetrennt und stellen Vielfache der ungefähr 50 kbp großen monomeren Lambda-DNS dar.

Die Methode ist also empfindlich genug, um Schädigungen an DNS-Molekülen in Chromosomengröße schon bei kleinen Bestrahlungsdosen nachzuweisen, die Reparaturstudien biologisch noch sinnvoll erscheinen lassen.

Nachdem in einem kleinen Vortest festgestellt worden war, daß sich ein S1-Nuclease-Verdau in geschmolzener Agarose durchführen läßt, wurde diese Methode zur Analyse von S1-Nuclease-sensitiven Stellen, ihrer eventuellen Quantifizierung und Reparatur gewählt.

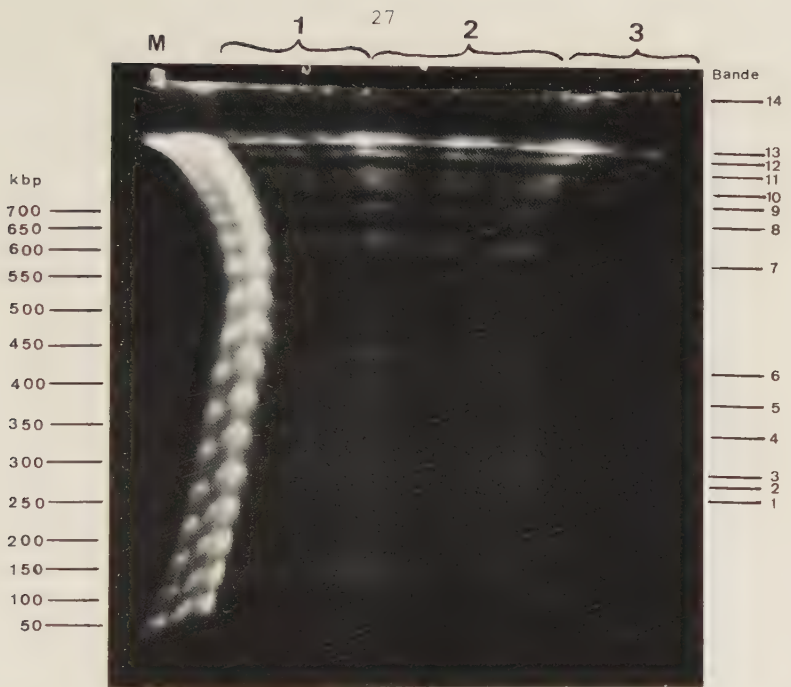


Abb.2:
Lysate unbestrahlter (1) und mit 16 Gy (2) bzw. 64 Gy
(3) bestrahlter Hefezellen aufgetrennt in der OFAGE.
Längenstandard war eine Lambda-Ladder.

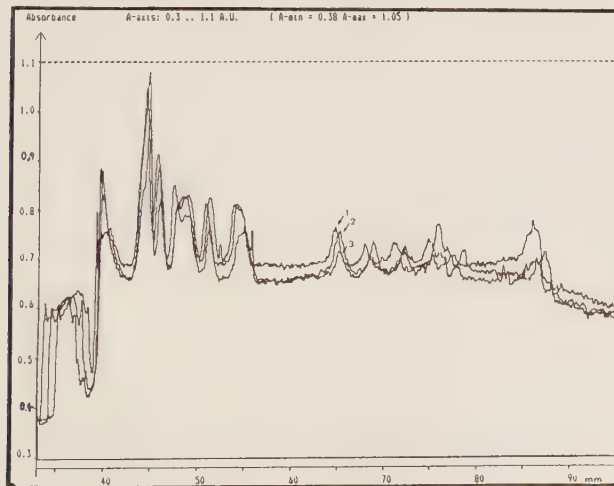


Abb.3:
Densitogramm des in Abb. 2 dargestellten OFA-Gels

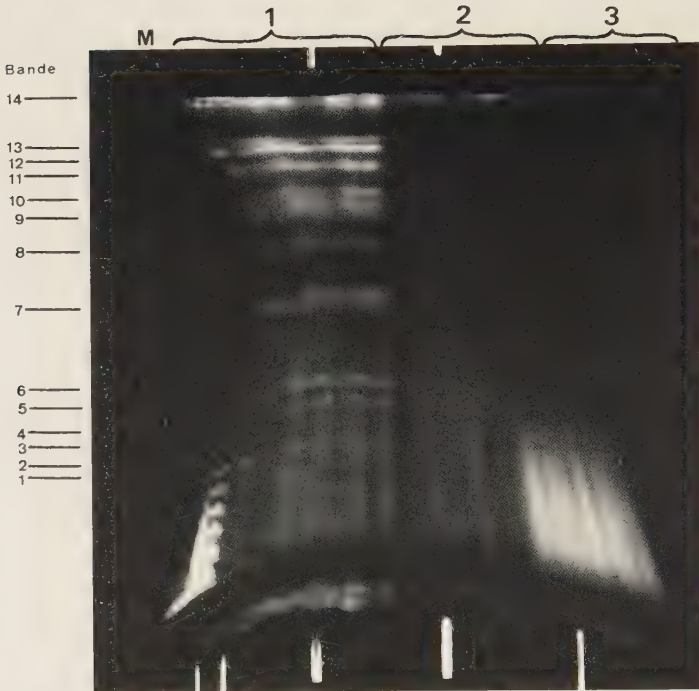


Abb.4:
Lysate mit 432 Gy (1), 1296 Gy (2) und 3888 Gy (3)
bestrahlter Zellen im OFA-Gel.
Als Längenstandard diente eine Lambda-Ladder (M).

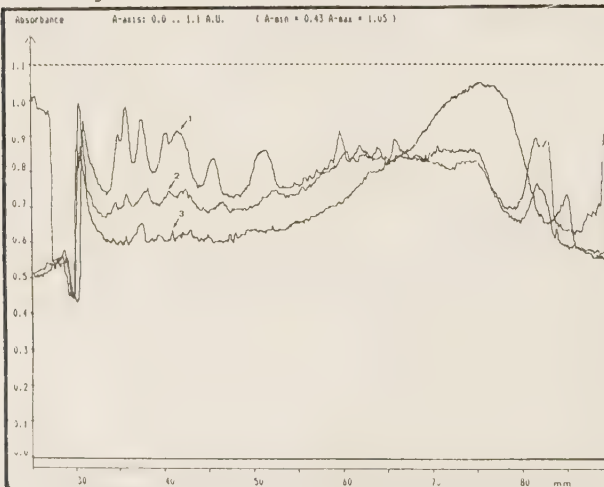


Abb.5:
Densitogramm des in Abb. 4 dargestellten OFA-Gels.

2.2. Spezifität der S1 Nuclease Bedingungen für die S1-Nuclease-sensitiven Stellen

Es mußten Inkubationsbedingungen gefunden werden, unter denen die S1-Nuclease unbestrahlte DNS nicht und bestrahlte nicht gegenüber von Einzelstrangbrüchen schneidet.

2.2.1. S1-Nuclease-Aktivität gegenüber DNase-erzeugten Einzelstrang-"Nicks"

Hierzu wurde linearisierte Plasmid-DNS, d.h. die mit der Restriktionsendonuclease Eco RI gespaltene Supercoil-DNS pBR 322 unter Bedingungen mit DNase I behandelt, die das doppelsträngige Molekül nicht degradierten aber die Einführung von Einzelstrangbrüchen, sog. "Nicks", bewirkten. Ein derart behandeltes Molekül wird nach Hitzedenaturierung im Agarosegel als Schmier sichtbar.

Auf diese Weise mit DNase genickte Plasmid-DNS wurde mit steigenden Mengen S1-Nuclease inkubiert. Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten konnte keine Doppelstrang-Aktivität und ein vernachlässigbar geringer Abbau von genickter DNS bis zu einer S1-Nuclease-Konzentration von 10 U/ug DNS festgestellt werden (s. Abb. 6).

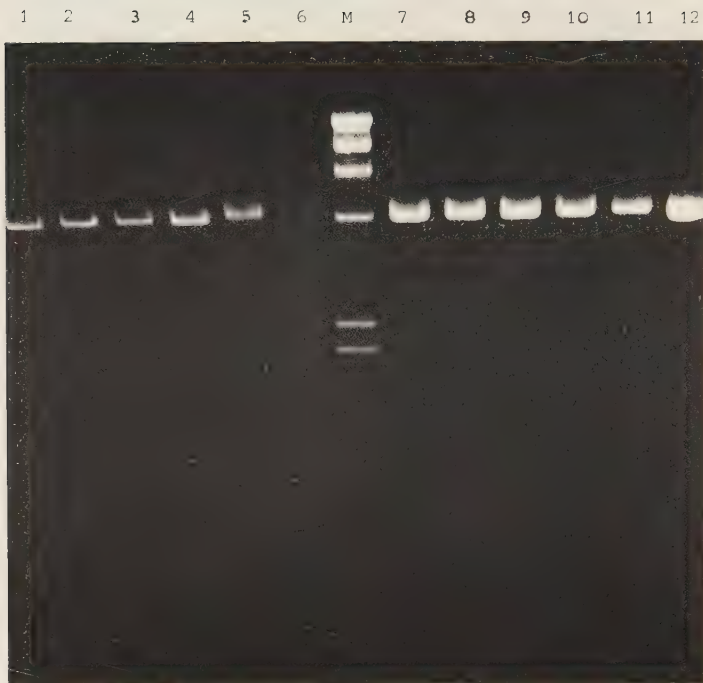


Abb.6:

Linearisierte Plasmid-DNS (pBR 322) wurde mit 2 ng/ug DNase I behandelt (1-5) und mit 0,1 U (1), 1 U (2), 10 U (3) und 0 U (4) S1-Nuclease pro ug DNS unter S1-Bedingungen inkubiert. Probe 5 wurde nicht inkubiert, Probe 6 ohne S1-Nuclease unter S1-Bedingungen inkubiert und anschließend hitzedenaturiert. Proben 6-10 wurden nicht mit DNase genickt und ohne weitere Behandlung auf das Gel aufgetragen (10) bzw. unter S1-Nuclease-Bedingungen mit 0,1 U (6), 1 U (7), 10 U (8) und 0 U (9) S1-Nuclease pro ug DNS inkubiert; M Längenstandard Lambda Hind III.

2.2.2. S1-Nuclease-Aktivität gegenüber Gamma-induzierten Einzelstrang-"Nicks"

Eco RI-linearisierte pER 322-DNS wurde in TE-Puffer mit steigenden Dosen Gamma-Strahlung bestrahlt. Ein Drittel einer jeden Bestrahlungsprobe wurde unter den Standard-S1-Bedingungen (10/ug) ohne S1-Nuclease, ein Drittel mit S1-Nuclease inkubiert, ein Drittel wurde hitzedenaturiert, um Einzelstrangbrüche sichtbar zu machen. Doppelstrangbruchinduktion konnte auf Grund der geringen Target-Größe erst bei Bestrahlung mit 800 Gy oder höher festgestellt werden (Abb. 7).

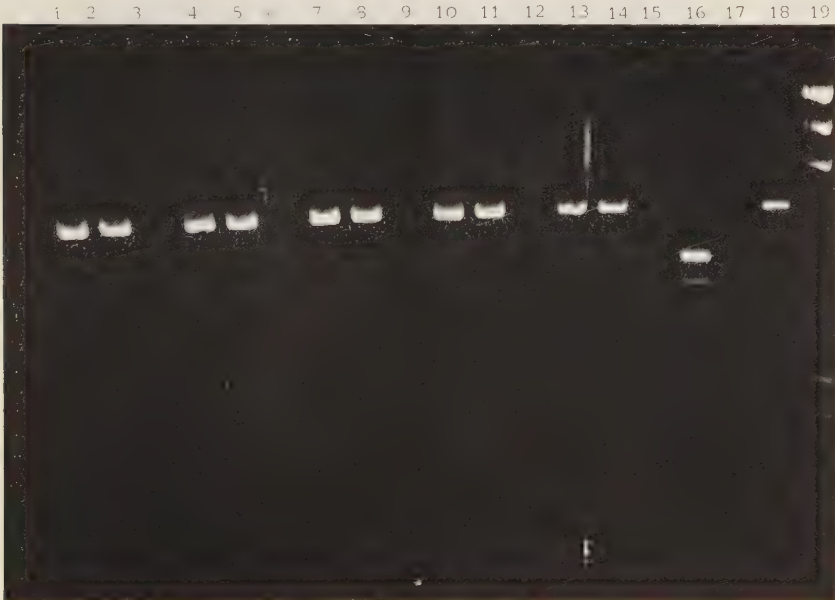


Abb. 7:
Linearisierte Plasmid-DNS (pER 322) wurde mit steigenden Gamma-Dosen bestrahlt, mit 0 Gy (1-3), 100 Gy (4-6), 200 Gy (7-9), 400 Gy (10-12), 800 Gy (13-15). Die DNS wurde daraufhin unter den Standard-S1-Bedingungen ohne S1-Nuclease (1,4,7,10,13,16) und mit S1-Nuclease (2,5,8,11,14,17) inkubiert. Proben 3,6,9, 12,15 wurden hitzedenaturiert. Die Spuren 16 und 17 zeigen M13-DNS nach S1-Inkubation, Probe 18 unbehandelte linearisierte pER 322 DNS, Probe 19 den Längenstandard Lambda Hind III.

Linearisierte pBR 322-DNS wurde daraufhin mit 400 Gy bestrahlt, einer Dosis, bei der noch keine Doppelstrangbrüche im Gel feststellbar waren. Die bestrahlte DNS wurde mit steigenden Mengen S1-Nuclease behandelt. Es zeigte sich, daß die DNS erst ab einem 150fachen S1-Nuclease-Überschuß, verglichen mit den verwendeten S1-Standard-Bedingungen, von der S1-Nuclease degradiert wird, erkennbar an einem Schmier unterhalb der dem linearen Plasmid entsprechenden Bande (Abb. 8). Bei S1-Nuclease-Konzentrationen bis zu 100 U/ug schneidet die S1-Nuclease unter den angegebenen Bedingungen nicht gegenüber eines gamma-induzierten Einzelstrangbruches.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Abb. 8:

Unbestrahlte, linearisierte pBR 322-DNS (1,2) und mit 400 Gy bestrahlte (3,4) wurden unbehandelt (1,3) und nach 5 minütiger Hitzedenaturierung (2,4) auf das Gel aufgetragen. Mit 400 Gy bestrahlte pBR 322-DNS (5-11) wurde mit steigenden S1-Nuclease-Konzentrationen unter S1-Bedingungen inkubiert, d.h. mit 0 U S1/ug DNS (5), 1 U/ug (6), 10 U/ug (7), 50 U/ug (8), 100 U/ug (9), 150 U/ug (10), 300 U/ug (11); Probe 12 zeigt mit Hind III verdauten Lambda-DNS als Längenstandard.

2.3. Untersuchung der Substratspezifität der Nuclease S1

DNS-Moleküle mit definierten DNS-Fehlstellen können unter Verwendung zweier DNS-Stränge, deren Sequenzen bis auf eine Mutation komplementär sind, durch in vitro-DNS/DNS-Hybridisierung hergestellt werden. Aus Phagen der M13mp-Serie können Heteroduplex-DNS mit verschiedenen Fehlpaarungen konstruiert werden. Die Phagenpartikel enthalten einzelsträngige zirkuläre DNS (ssDNS), den (+)Strang (Kornberg 1980). Daneben kann doppelsträngige DNS (RF-DNS), die (+) und (-)Strang enthält, aus infizierten *E. coli*-Zellen gewonnen werden. Durch thermische Denaturierung und Renaturierung einer Mischung von linearisierter RF-DNS eines Phagen und ssDNS eines zweiten kann eine Heteroduplex-DNS erzeugt werden. Diese Heteroduplex-DNS ist eine doppelsträngige zirkuläre DNS mit einem "Nick", einem Einzelstrangbruch im (-)Strang, eine "nicked duplex" DNS (ndDNS) (Kramer 1986). Die Analyse der Nachkommenschaft der beiden DNS-Stränge wird durch die Fähigkeit der Phagen der M13mp-Serie zur α -Komplementation erleichtert (Langley et al. 1975). Diese Phagen enthalten das lacZ α -Genfragment. Phagen, die für ein intaktes lacZ α -Genfragment kodieren, bilden nach Infektion eines *E. coli*-Stammes mit einer lacZ Δ M15 Mutation blaue Plaques in Gegenwart des Induktors IPTG und des Substrats x-gal (Messing et al. 1977). Es findet dann in der Zelle eine nicht kovalente Assoziation des Rumpfpoteins der β -Galactosidase, für das die zelluläre DNS kodiert, mit dem α -Fragment der β -Galactosidase statt, wobei ein aktives Enzym resultiert (Langley et al. 1975). Besitzt der Phage dagegen ein defektes lacZ - Genfragment, wie im Falle der ochre- und opal-Mutationen, so sind die Plaques farblos (Messing et al. 1977).

Ziel der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Analyse war es, zu prüfen, ob ein fehlgepaartes Basenpaar von der Nuclease S1 angegriffen wird und ob Präferenzen für bestimmte Typen von Fehlpaarungen vorliegen, d.h. Transitionen oder Transversionen bevorzugt erkannt werden. Als Positiv-Kontrolle für die Aktivität der S1 Nuclease diente die ndDNS, die aus der M13mp2-RF-DNS und der einzelsträngigen, im lacZ- α -Fragment um 3 Basen deletierten DNS. Das lacZ- α -Gen-Fragment wurde hierzu aus einem anderen Phagen (M13cg5 Δ 3) in einen M13mp2 Phagen umklo- niert, um die gleichen flankierenden Sequenzen vorliegen zu haben, wie im Falle der übrigen konstruierten ndDNS- Spezies. Die so gebildete ndDNS enthält einen "Loop" von 3 Basen, der erwartungsgemäß groß genug sein sollte, um als Target für die S1-Nuclease zu fungieren (Silber und Loeb 1981).

Als Negativ-Kontrolle wurde M13mp2-Wildtyp-RF-DNS gegen M13mp2-ssDNS hybridisiert, also eine ndDNS ohne Mismatch geschaffen. Diese sollte von einem S1-Nuclease-Verdau unbeeinflusst bleiben.

Das gesamte Pvu II-Fragment hat eine Länge von 268 bp und wird von Codon 11 in eine 70 bp und eine 198 bp große Sequenzfolge unterteilt.

Pvu II hat folgende Erkennungssequenz: CAG $\downarrow$ CTG

GTC $\uparrow$ GAC.

Nach Pvu II-Verdau entstehen also stumpfe DNS-Enden, sog. "blunt ends". Durch Reaktion mit Polynucleotidki- nase und γ - 32 P-ATP wurde die OH- Gruppe am 5'-Ende gegen eine radioaktive 32 P-Phosphatgruppe ausgetauscht (Maniatis et al. 1982).

Die Sequenzen, in die das Codon 11 eingebettet ist, sehen folgendermaßen aus:

Paarungstyp	Sequenz
leu/leu	CGTTTTACAACTCGT GCAAA <u>AT</u> GTTGAGCA
ser/op	CGTTTGACAACTCGT GCAA <u>AGT</u> GTTGAGCA
leu/oc	CGTTTAACAACTCGT GCAAA <u>AT</u> GTTGAGCA
ser/oc	CGTTTAACAACTCGT GCAA <u>AGT</u> GTTGAGCA
oc/ser	CGTTTCACAACTCGT GCAA <u>ATT</u> GTTGAGCA
op/ 3	<u>TGA</u> CCTT CAACTCGT GCAA GTTGAGCA

Die nach dem S1-Verdau im denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennte, radioaktiv markierte DNS der verschiedenen Fehlpaarungsspezies ergab das in Abb. 9 abgebildete Autoradiogramm.

Abb.9:

Autoradiogramm der in einem 4%igen, denaturierenden, 7 M Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten, mit Polynucleotid-Kinase am Pvu II-Ende markierten Einzelstränge nach S1-Verdau mit S1-Nuclease (2,4,6,8,10,12) und ohne S1-Nuclease (1,3,5,7,9,11). Die doppelsträngigen Pvu II-Fragmente wurden dem S1-Verdau unterworfen.

Codon 11 der verschiedenen Proben:

1 und 2	TTA (perfekte AAT Basenpaarung)
3 und 4	TGA (Fehlpaarung) AGT
5 und 6	TAA (Fehlpaarung) AAT
7 und 8	TAA (Fehlpaarung) AGT
9 und 10	TCA (Fehlpaarung) ATT
11 und 12	TGA-Loop

Die Schwäche der Signale könnte, außer an einer geringen Markierungseffizienz und zu geringer DNS-Mengen, daran liegen, daß die S1-Nuclease die schon markierten 5'-Endnucleotide abdaute.

1 2 3 4 5 6 7 9 8 10 11 12



bp

70

198

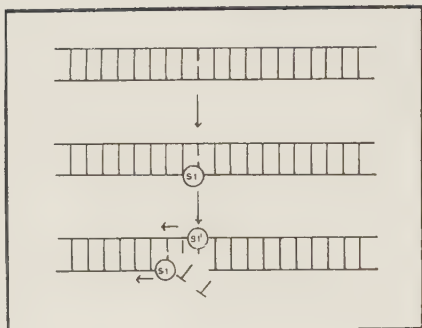
268

Die perfekte Paarung des Codons für Leucin wurde offensichtlich von der Nuclease Sl nicht erkannt, ebenso wenig wie der Mismatch G/G. In den Spuren der entsprechenden Proben konnte außer der 268 bp-Bande, die dem ungeschnittenen, noch aus dem Hybridisierungsmix stammenden Pvu II-Fragment entspricht und die am Gelende lokalisiert ist, keine Bande identifiziert werden.

Die Fehlpaarungen A/A, A/G und C/T ebenso wie der Dreierloop TGA wurden offensichtlich von der Sl-Nuclease unter den angewandten Bedingungen für den Sl-Verdau erkannt. Sichtbar sind in den Spuren der mit Sl-Nuclease verdauten Proben jeweils vier schwache Banden und die 268 bp-Bande.

Folgende Erklärungsmöglichkeit ergibt sich:

Die Incision des Enzyms Sl-Nuclease könnte in zeitlicher Abfolge an beiden Strängen der DNS stattgefunden haben. Die Aktivität des Enzyms könnte zunächst einen Bruch im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNS am "single base mismatch" bewirkt haben. Weiteres, einzelsträngiges "Abknabbern" am 3'Ende der Bruchstelle, sog. "nibbling", führte dann zu je zwei Banden, die vom 70 bp-Fragment abstammen, und zwei Banden, die vom 198 bp-Fragment abstammen. Diese zwei zugehörigen Banden unterscheiden sich nach dieser Vorstellung jeweils nur dadurch, daß die Sl-Nuclease an einem der beiden Stränge einige Basen abgedaut hat. Warum nur einer der beiden Stränge als Angriffsort für die Sl-Nuclease dient, ist unklar. Die Möglichkeit, daß einfach eine zeitliche Differenz in der Reaktion besteht wurde stark vereinfacht in der nachstehend dargestellten Skizze einer solchen denkbaren Reaktionsabfolge verbildlicht.



Ein Enzym-Molekül erkennt die fehlgepaarte Stelle in der DNS, incidiert, führt einen Doppelstrangbruch herbei und knabbert den gebrochenen Strang weiter an. Ein zweites Molekül führt einige Zeit später dieselbe Reaktion am gegenüberliegenden Strang aus.

Über die Möglichkeit, daß die Enzym-Moleküle dabei sequenzspezifisch (gedacht ist an A/T-reiche Regionen), oder konformationsspezifisch vorgehen, kann nur spekuliert werden. Welches Signal die S1-Nuclease als Stoppsignal erkennt, ist völlig offen. Denkbar wären hierbei Konformationsänderungen im DNS-Molekül (z.B. ein Wechsel von der B- zur Z-Konformation), methylierte Basen oder G/C-reiche Regionen (Wiegand et al. 1975; Shenk et al. 1975; Dodgson und Wells 1977; Pulleyblank et al. 1985; Singleton et al. 1984; West und Körner 1985).

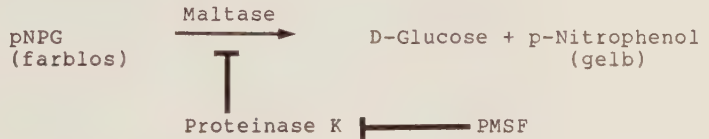
Im derzeitigen Stadium dieser Experimente können hierzu keine stichhaltigen Aussagen gewagt werden, jedoch ist diese Fragestellung Gegenstand laufender, weiterer Untersuchungen.

2.4. Untersuchungen zur Sl-Aktivität in Agarose

Um eine Inaktivierung der Sl-Nuclease durch die für die Lysatherstellung nötige Proteinease K zu verhindern wurde der Proteinase K-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid eingesetzt.

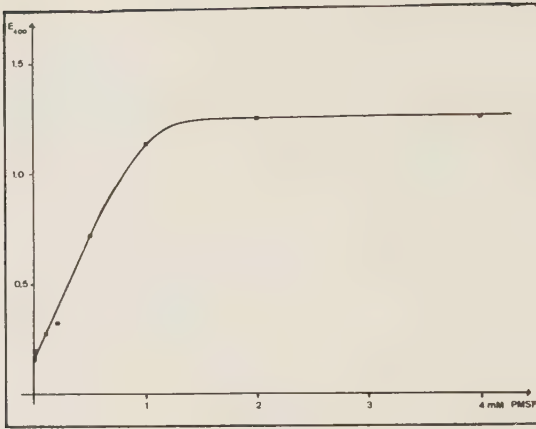
2.4.1. Inhibierung der Proteinase K

Die Wirkung von PMSF als Proteinase K-Inhibitor wurde mit Hilfe der durch die Proteinase K gehemmte α -D-Glucosid-Glucohydrolase Maltase aus Hefe studiert. Maltase katalysiert die Umsetzung des farblosen p-Nitrophenyl-Glucosids (pNPG) in D-Glucose und gelbes p-Nitrophenol. Diese Umsetzung wurde als Testsystem für die Wirksamkeit der Proteinase-Hemmsubstanz verwendet entsprechend dem folgenden Schema:



Die Reaktionsansätze zeigten deutlich, daß erstens Maltase von Proteinase K gehemmt wird, und zweitens PMSF als Proteinase K-Inhibitor wirkt, wobei bei einer Konzentration von 1,3 mM PMSF eine Sättigung erreicht wird (Abb. 10).

Abb. 10:
Aufhebung der durch Proteinase K gehemmten Maltase-katalysierten Umsetzung von pNPG in D-Glucose und p-Nitrophenol durch PMSF. Gemessen wurde die Bildung des gelben p-Nitrophenol bei 400 nm im Photometer.



2.4.2. Nachweis der S1-Nuclease-Aktivität an partiell hitzedenaturierter Hefe-DNS in Lysat-Blöckchen

Die 100 μ l-Lysatblöckchen wurden nach Equilibrierung mit 1 x S1-Salzen bei 65°C geschmolzen, zwei Proben 1/2 Minute bei 100°C inkubiert und auf Eis geschockt. Nach erneutem Schmelzen wurde der S1-Verdau mit 10 U S1 Nuclease durchgeführt (Abb. 11). Da die S1-behandelte Probe deutlich abgebaut ist, kann davon ausgegangen werden, daß die S1-Nuclease mit partiell hitzedenaturierter Hefe-DNS aus Lysaten in Agarose reagiert.



Abb. 11:
S1-Nuclease-Behandlung nicht hitzebehandelter (1) und partiell hitzedenaturierter (2,3) Hefe-DNS eines Agaroselysats, mit S1-Nuclease (2) und ohne S1-Nuclease (1,3); Lambda Hind III-geschnitten diente als Längenstandard (M).

2.4.3. Doppelstrang-Exonuclease-Aktivität der S1-Nuclease

Lysatblöckchen wurden geschmolzen und mit S1-Nuclease bis zu einer Konzentration von 50 U/ug DNS behandelt. Doppelstrang-Exonuclease-Aktivität, erkennbar an einem auf DNS-Fragmente zurückgehenden Schmier unterhalb der chromosomalen DNS-Bande, konnte erst ab 40 U/ug DNS entdeckt werden (Abb. 12).



Abb. 12:
 Inkubation von genomischer Hefe-DNS in Agaroselysaten unter S1-Bedingungen ohne S1- Nuclease (1), mit 10 U/ug (2), 20 U/ug (3), 30 U/ug (6), 40 U/ug (4) und 50 U/ug (5) DNS; Lambda Hind III als Längenstandard (M).

2.4.4. Nachweis der S1 Nuclease-Aktivität an doppelsträngiger Lambda-DNS und einzelsträngiger M 13-DNS

Doppelsträngige Lambda-DNS (BRL) bzw. einzelsträngige M 13-DNS wurden in 0,6 % low-melting Agarose eingegossen, geschmolzen und mit steigenden Mengen S1-Nuclease verdaut. Die Auftrennung im Agarosegel gab deutlich zu erkennen, daß doppelsträngige Lambda-DNS in keinem Fall angegriffen wurde, wohingegen M 13-Einzelstrang-DNS mit steigender S1-Nuclease-Konzentration zunehmend abgebaut wurde (Abb. 13).

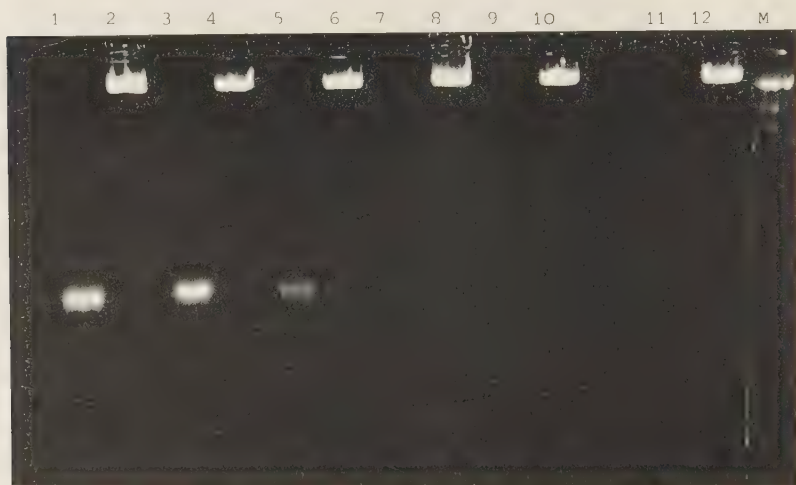


Abb. 13:

Verdau von Lambda-DNS und M 13-DNS in Agarose mit steigenden Konzentrationen an S1-Nuclease. Inkubation unter S1-Bedingungen von Lambda-DNS (2,4,6, 8,10,12) bzw. M 13-DNS (1,3,5,7,9,11) ohne S1-Nuclease (1,2), mit 10 U/ug (3,4), 20 U/ug (5,6), 30 U/ug (7,8), 40 U/ug (9,10), 50 U/ug (11,12) DNS; Längenstandard Lambda Hind III (M).

2.4.5. Einfluß von PMSF auf den S1-Verdau von Lambda-DNS

1 µg Lambda-DNS (BRL) wurde in 100 µl 0,6 % low-melting Agarose eingebettet, mit 1 x S1-Salzen equilibriert und auf pH 4,5 eingestellt. Der S1-Verdau von unbehandelter bzw. partiell hitzedenaturierter LambdaDNS erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K bzw. PMSF. Es wurde deutlich, daß die S1-Nuclease partiell hitzedenaturierte Lambda-DNS sowohl in Gegenwart von PMSF als auch von Proteinase K abbaut (Abb. 14). Vorsichtshalber wurde bei allen künftigen S1-Nuclease-Behandlungen PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM zur Inaktivierung von Proteinase K und zelleigenen Proteinasen zugesetzt.



Abb. 14:

In low-melting Agarose eingegossene Lambda-DNS wurde ohne Hitzebehandlung (1,5,9,13), nach 1-minütiger (2, 6,10,14), 2-minütiger (3,7,11,15) bzw. 3-minütiger (4,8,12,16) Hitzedenaturierung in Gegenwart von 10 mg/ml Proteinase K (1-8), und/oder 1 mM PMSF (5-12) mit S1-Nuclease (1-12) bzw. ohne S1-Nuclease (13-16) unter S1-Bedingungen inkubiert; Längenstandard Lambda, Hind III-geschnitten (M).

2.4.6. Untersuchung des Einflusses von PMSF auf Lambda- und M 13-DNS in Agarose

Doppelsträngige Lambda-DNS (BRL) und einzelsträngige M 13-DNS wurden in Agarose eingegossen, geschmolzen und in Gegenwart bzw. Abwesenheit von PMSF und/oder Proteinase K inkubiert. Die Versuche ohne Sl-Nuclease ließen erkennen, daß weder PMSF, noch die Proteinase K, noch die sauren Sl-Bedingungen die DNS in einer Art verändern, die im Gel sichtbar würde. Die Auftrennung der Proben nach Sl-Verdau bewies erneut, daß die Doppelstrang-Exonuclease-Aktivität der Sl-Nuclease vollständig unterdrückt und die Einzelstrang-Aktivität in den durchgeführten Experimenten voll ausgeprägt war, da die doppelsträngige Lambda-DNS keine Anzeichen eines Abbaus trägt, während die einzelsträngige M 13-DNS nach Sl-Verdau vollkommen abgebaut war (Abb. 15).

λ —

M13 —

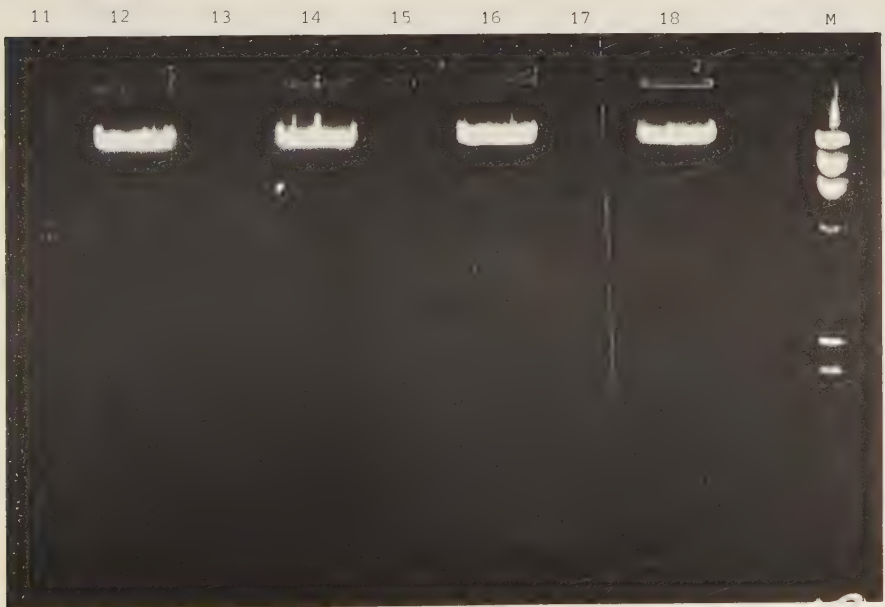


Abb. 15:

In Agarose eingegossene Lambda-DNS (2,4,6,8,10,12,14,16, 18) bzw. M 13-DNS (1,3,5,7,9,11,13,15,17) wurden inkubiert mit 10 mg/ml Proteinase K (5,6,9,10,13,14,17,18) und/oder 1 mM PMSF (7,8,9,10,15,16,17,18) unter S1-Bedingungen ohne S1-Nuclease (1-10) und mit S1-Nuclease (11-18).

2.4.7. Einfluß des Proteinase K-Inhibitors PMSF auf den Sl-Verdau von Hefelysaten

Die in Lysatproben enthaltene Proteinase K wurde in einem 0,6 % low-melting Agarosegel abgetrennt, die chromosomale DNS-Bande ausgeschnitten, mit 1 x Sl-Salzen equilibriert, partiell hitzedenaturiert und in Gegenwart von PMSF und/oder Proteinase K mit Sl-Nuclease behandelt. Der auf kleine Molekülbruchstücke zurückgehende niedermolekulare DNS-Schmier der partiell hitzedenaturierten, Sl-Nuclease-behandelten Proben im unteren Gelbereich, der trotz RNS-Überlagerung sichtbar ist, wurde als Zeichen für die Aktivität der Sl-Nuclease sowohl in Gegenwart von PMSF als auch Proteinase K gewertet. Doppelstrang-Exonuclease-Aktivität konnte nicht festgestellt werden, es fehlte der typische Schmier in den Spuren der nicht hitzedenaturierten Proben (Abb. 16).



Abb. 16:

Aufgereinigte, unter S1-Bedingungen inkubierte Lysat-DNS ohne Hitzedenaturierung (1,3,5,7,9,11,13,15,17) bzw. mit 40 Sekunden langer Hitzedenaturierung (2,4,6,8,10,12,24,26,18), ohne Zusatz (17,18), in Gegenwart von 1 mM PMSF (1,2,7,8,9,10,13,14,15,16), in Gegenwart von 10 mg/ml Proteinase K (5,6,7,8,11,12,13,14) ohne S1-Nuclease (1,2,11-18) und mit S1-Nuclease (3-10); Lambda Hind III als Längenmarker (M).

2.4.8. Bei jeder S1-Behandlung von Lysaten zur Auftrennung in der OFAGE wurden in Agarose eingegossene M 13-Einzelstrang-DNS und Doppelstrang-DNS des 7kb großen Bsa-Plasmids exakt gleich behandelt wie die Lysate und im konventionellen Agarosegel aufgetrennt, um eine Kontrolle über den Verlauf des S1-Verdaus zu haben (Abb. 17).

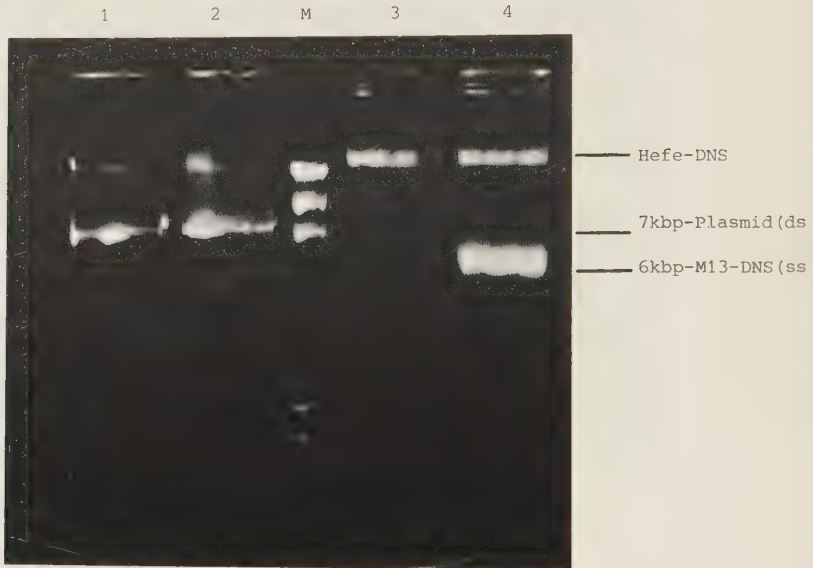


Abb. 17:
Kontrolllexperiment bezüglich des S1-Verdaus
Plasmid Bsa (3,4) und M 13-Einzelstrang-DNS (1,2) wurden unter S1-Bedingungen inkubiert mit S1-Nuclease (2,3) und ohne S1-Nuclease (1,4) entsprechend dem S1-Verdau der Hefe-Lysate; Längenstandard Lambda Hind III.

2.5. Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Lysat-Herstellung

Um sicherzugehen, daß bei exakt gleichartiger Herstellung verschiedener Lysate immer die gleiche Menge DNS im OFA-Gel aufgetrennt wird, d.h. alle einander entsprechenden Banden in den zu verschiedenen Lysaten gehörenden einzelnen Spuren dieselbe Intensität zeigen, wurden identische Lysate hergestellt, diese im OFA-Gel aufgetrennt (Abb. 18) und die Gelphotonegative densitometrisch ausgemessen. Die Länge der infolge der Feldeffekte ungleich langen Banden wurde auf die Länge der Auftragstasche bezogen und das resultierende Verhältnis der beiden Größen zueinander auf die ausgemessenen Flächen unter den den Banden entsprechenden Kurven umgerechnet. Es ergab sich, daß die Abweichung der Bandenintensitäten der verschiedenen Lysate in den verschiedenen Spuren innerhalb der Fehlergrenze der angewandten Meßtechnik (Densitometer, Fotografie) lagen und daher vernachlässigt werden können.

a



b

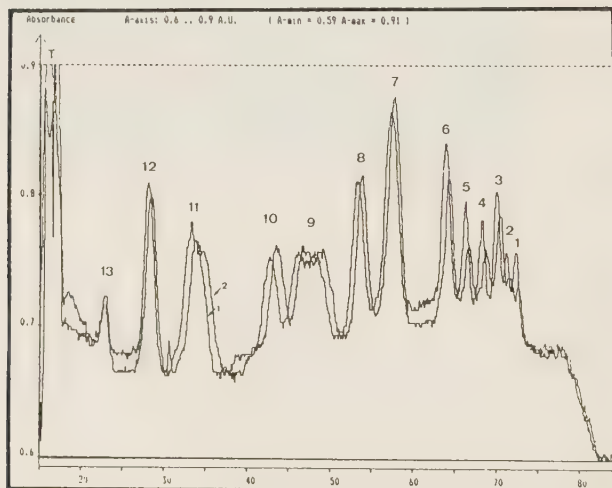


Abb. 18:

a) Proben gleichen Volumens zweier identisch hergestellter Lysate wurden unter den Standard-Bedingungen einer OFAGE unterworfen, das Gel angefärbt, entfärbt und fotografiert, wie im Methodenteil beschrieben.

b) zugehöriges Densitogramm

3. DISKUSSION

Nach Abschluß aller notwendigen Vorversuche waren die Reaktionsbedingungen für den S1-Nuclease-Verdau spezifisch definiert und reproduzierbar für alle geplanten Versuche.

Die Nuclease S1 zeigte unter den optimierten Bedingungen keine Doppelstrang-Exonuclease-Aktivität, schnitt doppelsträngige DNS nicht gegenüber einem Einzelstrangbruch, wurde nicht von PMSF und Proteinase K inhibiert und arbeitete in flüssiger Agarose wie im wässrigen System.

Als Methodik zur Strangbruchanalyse nach Bestrahlung mit gleichzeitiger Untersuchung der Wirkung von S1-Nuclease im Kerngenom von *Saccharomyces cerevisiae* eignete sich nur die Orthogonale Wechselfeldelektrophorese OFAGE und die zugehörige DNS-Isolierung in Agaroseblöckchen.

In den Experimenten, die in Teil II und Teil III der Arbeit dargestellt sind, wurden die Ergebnisse von Teil I berücksichtigt und in die weitere Methodik aufgenommen.

Teil II

Untersuchung von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen im 2um-Ring der Hefe Saccharomyces cerevisiae nach in vivo-Bestrahlung mit Gamma-Strahlen

1. EINLEITUNG

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen im endogenen 2um-Plasmid der Hefe.

Verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, (*cir*⁺) genannt, sind Träger einer einzelnen Klasse plasmidähnlicher circulärer, doppelsträngiger DNS Moleküle (Hollenberg et al. 1969; Guerineau et al. 1971 und 1974; Clark-Walker 1972 und 1973), von der wenige natürliche Varianten gefunden wurden (Livingston 1977; Cameron et al. 1977). Sie messen ungefähr 2 um im Umfang (Sinclair et al. 1967; Hollenberg et al. 1970; Stevens und Moustacchi 1971; Clark-Walker et al. 1974; Petes und Williamson 1975; Guerineau et al. 1976; Hollenberg und Royer 1979;) und zeigen eine ähnliche Sequenzorganisation (Livingston 1977; Hollenberg et al. 1976; Beggs et al. 1976; Livingston und Klein 1977; Hollenberg et al. 1976). Die verbreitetste Variante, *Scpl*, die man allgemein 2um-Plasmid nennt, wurde physikalisch kartiert unter Zuhilfenahme von Elektronenmikroskopie (Beggs et al. 1976; Hollenberg und Royer 1979; Royer und Hollenberg 1977), Restriktionsenzymen (Livingston 1977; Cameron et al. 1977) und rekombinanten DNS-Techniken (Hindley 1977; Gubbins et al. 1977; Beggs 1978; Hollenberg 1978) (Abb.19).

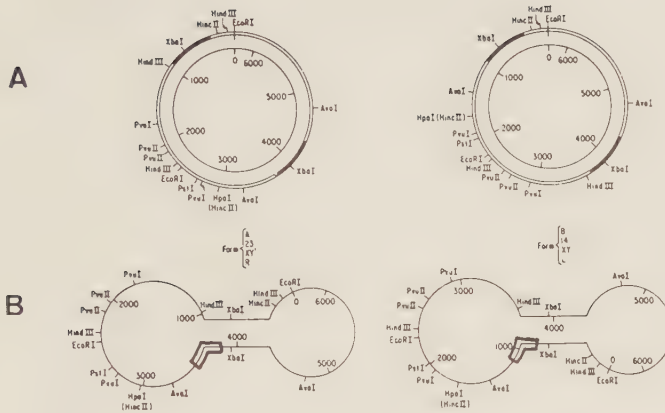


Abb. 19:
 Restriktionskarte des in zwei isomeren Formen natürlich
 in der Hefe vorkommenden 2µm-Rings
 (A: doppelsträngige Darstellung; umgekehrte Repetitionen
 gefüllt.
 B: einzelsträngige Darstellung; umgekehrte Repetitionen=
 parallele Linien, Replikationsursprung= Balken)
 (nach Broach 1981)

Das Monomer ist ungefähr 6,3 kb groß und besteht aus zwei nicht identischen Sequenzen einer Länge von 2774 bzw. 2346 bp, die voneinander durch zwei umgekehrte Repetitionen von ungefähr 600 bp getrennt sind. Intramolekulare homologe Rekombination innerhalb dieser Repetitionen führt zu zwei natürlich vorkommenden Isomeren (Hollenberg et al. 1976; Bell und Evers 1979) und multi-meren Formen dieses Plasmids (Hollenberg et al. 1976). Die Isomere unterscheiden sich in der Orientierung der beiden nicht repetitierten Regionen zueinander (Beggs et al. 1976; Guerinneau 1976;).

Bislang konnte kein definierter Phänotyp mit dem Besitz des 2um-Ringes in (cir^+) Stämmen assoziiert werden (Guerineau et al. 1974; Livingston 1977; Saunders et al. 1979). Es wurde keine Defizienz in (cir^0)-Stämmen gefunden, die kein 2um-Plasmid enthalten (Tabak 1977). Die biologische Funktion dieses autonom replizierenden Plasmids ist unbekannt.

Der größte Teil des Plasmids wird in vivo transkribiert (Broach et al. 1979; Sutton und Broach 1985). Das Genprodukt der kodierenden Region A, die sogenannte FLP-Rekombinase, ist für die zu den beiden Isomeren führende Interkonversion verantwortlich, was mit Hilfe von Deletionsstudien gezeigt werden konnte (Andrews et al. 1985; Volkert und Broach 1986; Senecoff et al. 1985).

Jedes 2um-Chromosom repliziert einmal pro Zellzyklus in der frühen S-Phase (Petes und Williamson 1975; Livingston und Kupfer 1977; Zakian et al. 1979). Die Replikation sowohl der 2um-DNS als auch der nuklearen DNS wird blockiert von alpha-Hormon (Zakian et al. 1979) und ist abhängig von den Zellzyklusgenen *cdc4*, 7, 28 (Petes und Williamson 1975; Livingston und Kupfer 1977; Zakian et al. 1979). Der Ursprungspunkt der DNS-Replikation des Plasmids wurde als ca. 350 bp große Sequenz kartiert, die hauptsächlich in einer der umgekehrten Repetitionen lokalisiert ist, sich aber auch in die benachbarte einzigartigen Region hin erstreckt (s. Abb. 18B) (Futcher 1986). Diese cis-Funktion ist für die Replikation ausreichend.

Hohe Kopienzahlen werden gewährleistet durch die Anwesenheit der Genprodukte aus den Regionen B, C und D, die auch REP1, REP2 und REP3 genannt werden (Jayaram et al. 1983). Die 2um-Plasmide können mit diesem Replikationsapparat die Zellzykluskontrolle umgehen (Futcher und Cox 1983; Jayaram et al. 1983) und liegen mit einer Kopienzahl von 50-100 Kopien pro Zelle vor (Hollenberg et al. 1970; Clark-Walker und Miklos 1974; Seligy et al. 1980). Das 2um-Plasmid integriert nicht in chromosomale oder mitochondriale DNS (Cameron et al. 1977; Tabak 1977). Es scheint zumindest zeitweilig, in Abhängigkeit vom Zellzyklus, im Nukleoplasma lokalisiert zu sein (Taketo et

al. 1980; Stevens und Moustacchi 1971). In der Zelle kommt es als Minichromosom vor, das eine den Hefe-Chromosomen vergleichbare Chromatinstruktur aufweist (Nelson und Fangman 1979; Veit und Fangman 1985).

Da die geplante Untersuchung mittels Strangbruchanalyse Aufschlüsse über gamma-induzierte Basenschäden im eukaryotischen Chromatin liefern sollte, wurde als Untersuchungssystem zunächst das endogene 2 μ -Plasmid der Hefe gewählt, das bislang noch nicht Gegenstand einer derartigen Analyse war. Die Vorteile dieses Systems liegen in der eindeutig durchführbaren Strangbruchanalyse mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese, wie sie nur für Plasmide möglich ist, die in der Zelle als Supercoil vorliegen. Bruchinduktion überführt den Supercoil in den entspannten Ring (im Falle von Einzelstrangbrüchen) bzw. in das lineare Molekül (im Falle von Doppelstrangbrüchen). Da diese Plasmidformen im Agarosegel ein deutlich unterscheidbares Migrationsverhalten zeigen, ist eine densitometrische Quantifizierung möglich (Kessler et al. 1971).

Infolge der kleinen Größe des Plasmids, seiner hohen Kopienzahl und seiner Isolierung in Reinform stünde einem die Möglichkeit zu Sequenzierung, zu Oligonukleotid-gerichteter Mutagenese und genauerer chemischer Untersuchung der Basenschäden an einem in vivo-System in Hefe offen.

Da die Nucleosomenanordnung dieser 2 μ -Plasmide, die Einfluß haben könnte auf die gamma-induzierte Schadenssetzung in der DNS, wie das von Säugerchromosomen bekannt ist (Madhani et al. 1986), sich nicht von der chromosomalen unterscheidet, ließe dieses relativ einfach handhabbare System Rückschlüsse auf Schadensausmaß und -verteilung in den Chromosomen der Hefe zu.

In früheren Arbeiten (McCready und Cox, 1980) konnte gezeigt werden, daß nach in vivo-UV Bestrahlung in den 2 μ -Chromosomen Dimere mit derselben Rate induziert werden wie in chromosomaler DNS. Gab man den Zellen nach Bestrahlung Gelegenheit zur Reparatur unter normalen

Wuchsbedingungen, so fand man, daß die strahleninduzierten Dimere in der Plasmid-DNS in reparaturprofizienten Wildtyp-Stämmen repariert wurden, was auf die Aktivität des Exzisionsreparatursystems zurückgeführt wurde. In *rad1*-Mutanten, die einen Defekt in der Exzisionsreparatur aufweisen, wurden Dimere in der 2 μ m-DNS mit Hilfe der Photoreaktivierung gespalten. Die Reparatur von UV-Schäden im 2 μ m-Plasmid scheint also kern-codiert abzulaufen.

Ebenso scheint die FLP-abhängige Rekombination des Plasmids, die für seine stabile Propagation nötig ist, in *rad52*-Stämmen nicht abzulaufen und zu einem Verlust des Plasmids zu führen (Schild et al. 1984). Mutationen im *RAD52*-Gen beeinträchtigen DNS-Reparatur und -Rekombination, d.h. Mechanismen, die über Doppelstrangbruchinduktion und deren Heilung ablaufen.

Die Suche nach gamma-induzierten Basenveränderungen in der DNS, die sensitiv gegenüber einem *S1*-Nuclease-Angriff sind, weil die DNS in dem geschädigten Bereich in Form ungepaarter Einzelstränge vorliegt, war als erster Schritt auf dem Wege zur Untersuchung der Reparatur derartiger Läsionen in diversen Reparaturmutanten von Hefe gedacht.

2. ERGEBNISSE

Die Intention der Experimente zu Beginn der Arbeit lag darin, die Eigenschaften dieser DNS-Spezies und ihr Verhalten nach Bestrahlung näher kennenzulernen. Aus diesem Grunde wurde die 2 μ m-DNS selektiv isoliert (Maniatis et al. 1982; Sigurdson et al. 1981; Birnboim und Doly 1979; Ballario et al. 1983), von chromosomaler DNS abgetrennt, mit Restriktionsenzymen gespalten und nach Auftrennung im Agarosegel mit einem Plasmid, das 2 μ m-Sequenzen trug, nach Southern (1975) hybridisiert. Restriktionsmuster und Autoradiogramm ließen keinen Zweifel daran, daß nach der angewandten Methodik 2 μ m-DNS isoliert worden war. Die isolierte DNS wurde als Supercoil identifiziert, indem sie einer schonenden DNase-Behandlung unterzogen und im Gel aufgetrennt wurde. Die bei 4 kbp im Gel wandernde Supercoil-Bande verschwand daraufhin, die Intensität der bei ca. 12 kbp migrierenden Bande des entspannten Moleküls wurde verstärkt und es tauchte eine Bande neu auf, die bei 6 kbp wanderte. Hierbei handelte es sich um die linearisierte 2 μ m-DNS.

Die aus bestrahlten Zellen isolierte DNS wurde mit Hilfe von Restriktionskartierung und Southern-Hybridisierungsexperimenten eindeutig als 2 μ m-Ring identifiziert. Zur Überprüfung, ob die einzelstrangspezifische S1-Nuclease die 2 μ m DNS grundsätzlich angreifen kann, wurde die mit Pst I linearisierte 2 μ m-DNS hitzedenaturiert und dann einem S1-Verdau unterworfen. Das Gelbild zeigte deutlich, daß das Molekül nach einminütiger Hitzebehandlung vollständig denaturiert war. Der 6,3 kbp große Einzelstrang bandierte auf ungefähr gleicher Höhe mit dem gleichgroßen M 13-Einzelstrang, der als Kontrolle mitlief. Nach S1-Verdau war sowohl die M 13-Kontroll-DNS als auch die hitzedenaturierte 2 μ m-DNS vollständig abgebaut. Das lineare doppelsträngige 2 μ m-DNS Molekül ist also unter den gewählten Reaktionsbedingungen der S1-Nuclease zugänglich, nicht jedoch der Supercoil, der u. a. mit Hilfe eines DNase-Nicking-Experiments als solcher identifiziert werden konnte. Er zeigte sich als gegenüber jeder Hitzedenaturierung resistent, was mit

seiner großen Renaturierungsgeschwindigkeit erklärt werden kann. Daher ließ er sich von der S1-Nuclease unter den angegebenen Bedingungen auch nicht abbauen.

Auch S1-Nuclease-Behandlung der 2 μ m-Supercoil-DNS aus bestrahlten Zellen (8000 bis 10000 Gy), führte nicht zu einem Intensitätsverlust der Supercoil-Bande im Gel oder einer Zunahme der dem linearen Molekül entsprechenden Bande im Vergleich zu 2 μ m-DNS aus unbestrahlten Zellen. Auch nach Linearisierung der 2 μ m-DNS aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen resultierte der S1-Verdau nicht in einem, bei Vorhandensein von S1-Nuclease sensitiven Stellen zu erwartenden Schmier im Gel unterhalb der 6kb-Bande.

Gamma-induzierte Doppelstrangbrüche konnten im Zuge dieser Versuchsserie nicht nachgewiesen werden. Isolierte 2 μ m-DNS aus mit 10 kGy bestrahlten Zellen zeigte im Gel keinen auf degradierte Fragmente zurückgehenden Schmier, sondern nur eine Intensitätsabnahme der Supercoil-Bande im Vergleich zur 2 μ m-DNS aus unbestrahlten Zellen.

Diese Versuche legten die Vermutung nahe, daß Plasmid-Moleküle die strahlen- und/oder präparationsinduzierte Brüche tragen, bei dieser selektiven Isolierungsmethode für Supercoil-DNS nicht erfaßt werden.

2.1. Untersuchung von Sl Nuclease sensitiven Stellen im 2um-Ring durch Hybridisierung von gesamtgenomischer DNS mit YEp2

Um sicherzugehen, alle, sowohl ungeschädigte als auch geschädigte 2um-Moleküle isoliert zu haben, wurde in den weiteren Experimenten gesamtgenomische DNS schonend präpariert und die 2um-DNS durch Southern-Hybridisierung mit YEp2, einem Plasmid, das 2um-DNS-Sequenzen beherbergt, sichtbar gemacht. Southern-Hybridisierung gegen einen pBR 322-Vektor mit einem 2um-DNS-Insert und einen -Vektor mit einer chromosomalen rDNS-Sequenz ermöglichte die Unterscheidung von 2um-DNS und chromosomaler DNS in den Gelbildern.

Mit Hilfe der schonenden Isolierungsmethode von gesamtgenomischer DNS aus Hefe nach Davis et al. 1980 sollte eine präparationsbedingte Induzierung von Brüchen im Supercoil des 2um circles vermieden werden.

Die Bestrahlung sowohl stationärer als auch logarithmischer Zellen erfolgte von 1000 bis 100000 Gy, um Strahlenschäden im 2um-Ring nachweisen zu können, die nach den bisherigen Untersuchungen zu erwarten waren (Andrews et al. 1984).

Das Gel wurde geblottet und der Filter mit YEp 2 hybridisiert (Abb. 20).

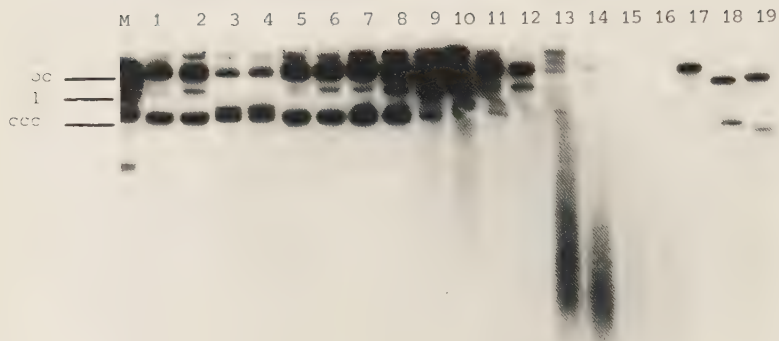


Abb. 20:

Gesamt-DNS aus unbestrahlten (1-4), mit 1000 Gy (5-8), 10000 Gy (9-12) und 100000 Gy (13-16) bestrahlten Zellen einer stationären Kultur (1,2,5, 6,9,10, 13,14) und einer logarithmischen Kultur (3,4,7,8,11, 12,15,16) nach Inkubation unter S1-Nuclease Bedingungen mit (2,3,6,8, 10,12,14,16) und ohne S1-Nuclease (1,3,5,7,9,11,13, 15). Lambda-DNS Hind III-verdaut (M) und YEp 2-Plasmid nach Spaltung mit Pst I (17), Pst I und BamH I (18) und Pst I und Sal I (19) als Längenstandards. Hybridisierungsprobe: YEp2

Die Spaltung der gesamtgenomischen DNS-Proben führte zu einer Linearisierung des 2µm-Ringes. Dieser Schritt sollte eventuelle S1-Nuclease sensitive Stellen, die im Supercoil der S1-Nuclease aus sterischen Gründen nicht zugänglich wären, im an den Restriktionsverdau anschließenden S1-Verdau erkennen lassen.

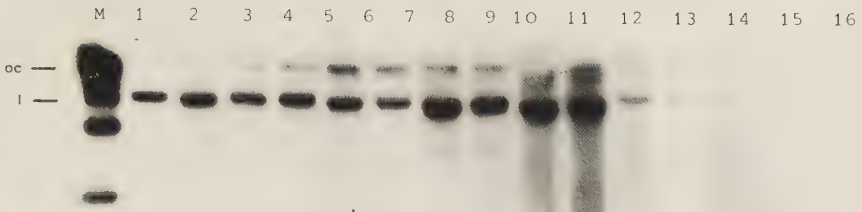


Abb 21:

Gesamt-DNS aus bestrahlten und unbestrahlten Zellen, im Agarose-Gel aufgetrennt nach Restriktionsverdau mit Pst I und S1-Nuclease, geblottet und gegen YEp2 hybridisiert; Bezeichnungen s. Abb. 20.
M13-Einzelstrang-DNS ohne (a) und mit (b) S1 Nuclease

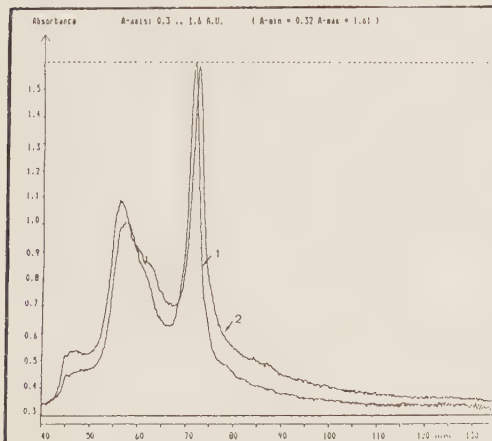


Abb. 22:

Densitogramm des in Abb. 21 dargestellten Autoradiogramms: 2µm-DNS aus Zellen, die mit 10 kGy bestrahlt wurden nach Inkubation unter S1-Nuclease-Bedingungen ohne S1-Nuclease (1) und mit S1-Nuclease (2).

Die Auswertung der Densitogramme der in Abb. 20 und 21 gezeigten Autoradiogramme ließ einen auf strahlungsinduzierte Brüche zurückzuführenden Massenverlust der 2 μ m-Ring-DNS erkennen, der sich bei einer Bestrahlung von 100000 Gy derart stark auswirkte, daß nur noch ein sehr schwaches Hybrisierungssignal nach langer Exponierungszeit sichtbar wurde. Damit konnte die Strahlenempfindlichkeit des 2 μ m-Supercoils gezeigt werden. Die Hybridisierungssignale der mit S1-Nuclease behandelten Proben zeigten identische Densitogramme verglichen mit den unbehandelten.

Aus dem in Abb. 22 stellvertretend für alle angefertigten Densitogramme dargestellten Densitogramm wurde rechnerisch die Bruchrate pro Molekül für Doppelstrangbrüche und S1-sites ermittelt, wie sie in Tab. 1 aufgelistet ist. Es ist klar ersichtlich, daß die Anzahl der Doppelstrangbrüche nach S1-Nuclease Behandlung von DNS aus bestrahlten Zellen nicht zunahm, S1-Nuclease-sensitive Stellen demnach nicht vorhanden waren.

Tab. 2:

Doppelstrangbrüche der 2µm-DNS aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen verschiedener Wachstumsphasen nach Inkubation mit und ohne S1-Nuclease. Die Zahl der Brüche pro Molekül erhielt man aus der Abnahme des Massenanteils der dem Supercoil entsprechenden Bande im Autoradiogramm (A) bzw. der dem mit Pst I linearisierten 2µm-Ring entsprechenden Hybridisierungsbande im Autoradiogramm (B) im Verhältnis zur Gesamt-DNS pro Spur. Sie ergab sich aus der Errechnung der Flächeninhalte der entsprechenden Densitometerkurven über $n(\text{Zahl der Brüche/Molekül}) = -\ln F$, wobei F die Fraktion der ungebrochenen Moleküle repräsentiert.

Dosis	Wachstumsphase	Brüche der 2µm-DNS			
		A		B	
		-S1	+S1	-S1	+S1
0 Gy	stationär	1.0	1.1	0.5	0.5
1 kGy	"	0.9	1.0	0.6	0.7
10 kGy	"	2.0	2.0	0.8	0.9
100 kGy	"	3.9	3.2	2.5	2.7
0 Gy	log	0.6	0.7	0.4	0.4
1 kGy	"	0.9	1.0	0.5	0.6
10 kGy	"	2.3	2.3	1.3	1.5
100 kGy	"	Spur nicht mehr abmeßbar			

Dasselbe Bild ergab sich bei Auftrennung exakt gleich großer Aliquots von gesamtgenomischer DNS aus unbestrahlten und mit 10 kGy bestrahlten Zellen nach Pst I-Spaltung und Hybridisierung gegen YEp2. Die Auswertung der Densitogramme der Autoradiogramme und Berechnung des Anteils ungebrochener Moleküle an der Gesamt-DNS ließ somit keinen S1-Effekt erkennen, ein Ergebnis, das für Parallelproben reproduzierbar war.

3. DISKUSSION

Nachdem bekannt war, daß UV-Bestrahlung im endogenen 2um-Ring von Hefe zum Auftreten von Dimeren führt (McCready und Cox 1980), wurde dieses Plasmid als Modellsystem für die Untersuchung der Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen, d.h. denaturierten DNS-Regionen im eukaryotischen Chromatin und ihrer Reparatur gewählt, da es die Vorteile einer auf Agarosegelen gut durchführbaren Strangbruchanalyse mit der Erfüllung der Forderung nach eukaryotischer, chromosomengleicher Nucleosomenanordnung verband.

Sl-Behandlung der aus bestrahlten Zellen isolierten 2um-DNS überführt den Supercoil und den open circle in das lineare Molekül, wenn Sl-Nuclease-sensitive Stellen in der DNS vorhanden sind (Abb 23). Sl-Nuclease-sensitive Stellen im linearen Fragment manifestieren sich nach Enzymbehandlung im Gel als "Schmier" unterhalb der entsprechenden Bande, der auf niedermolekulare Molekülbruchstücke zurückzuführen ist. Einzelstrangbrüche, die bei Bestrahlung induziert werden, entspannen den Super-twist und überführen ihn in den entspannten Ring.

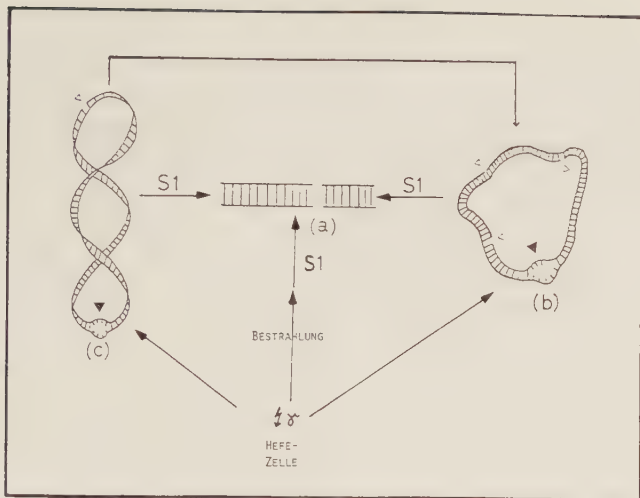


Abb. 23:

Zu erwartende Auswirkungen der S1 Nuclease Behandlung auf 2µm DNS aus bestrahlten Zellen, die S1 Nuclease sensitive Stellen (►) und Einzelstrangbrüche (▷) enthält.

Frühere Arbeiten (Frankenberg et al. 1981; Resnick und Martin 1976) berichteten, daß in *S. cerevisiae* $1,91 \times 10^{-9}$ Doppelstrangbrüche pro Nukleotid und Gy nach Bestrahlung mit Gammastrahlen induziert werden. Legt man die bisherigen Daten über S1-Nuclease sensitive Stellen zugrunde, so treten S1-sites bei gleicher Bestrahlungsdosis doppelt so häufig auf wie Doppelstrangbrüche (Martin-Bertram und Hagen 1979; Martin-Bertram 1981; Andrews et al. 1984; Martin-Bertram et al. 1983b; Martin-Bertram et al. 1984). Erfolgt die Induktion von Doppelstrangbrüchen und S1-Nuclease-sensitiven Stellen gemäß einer Poisson-Verteilung, so würden in hundert DNS-Molekülen der Länge 2µm (6,3 kbp), bei in vivo-Bestrahlung mit 10kGy 27 S1-Nuclease-sensitive Stellen entstehen. Das bedeutet, daß ein Viertel aller 2µm Plasmide pro mit 10 kGy bestrahlter Zelle eine S1-Nuclease-sensitive Stelle aufweisen müßte. Um den Anteil der eventuell geschädigten Moleküle zu erhöhen, wurde auch die Bestrahlungsdosis erhöht.

Bestrahlt man mit 100 kGy, so werden - unter der Voraussetzung, daß S1-Nuclease-sensitive Stellen etwa doppelt so häufig induziert werden wie Doppelstrangbrüche - pro 2µm-Ring 2,7 S1-Nuclease-sensitive Stellen erzeugt, wenn 100 Kopien des Plasmids pro Zelle vorliegen.

Unterwarf man die durch eine Gesamt-DNS-Präparation gewonnene DNS aus bestrahlten Zellen einem S1-Verdau, dessen Vollständigkeit immer durch ein Kontrollexperiment mit M 13-Einzelstrang-DNS überprüft wurde, so wurden nach Auftrennung im Agarosegel folgende Ergebnisse deutlich:

1. Führt man keinen Restriktionsverdau durch, so nahm die Fraktion des linearen Moleküls nach S1-Behandlung in keinem Falle zu, was bei vorhandenen S1-Nuclease-sensitiven Stellen im Supercoil und im entspannten Ring zu erwarten gewesen wäre. Die schonende Isolierungsmethode nach Davis (1980) lieferte fast ausschließlich Supercoil-DNS. S1-Verdau führte aber selbst bei Bestrahlungsdosen bis zu 100000 Gy nicht zu einem Massenverlust des Hybridisierungssignals, das der 2µm-Supertwist-DNS zuzuordnen ist, und einem Auftauchen eines der linearen 2µm-DNS entsprechenden Signals im Autoradiogramm.
2. Linearisierte man die aus bestrahlten Zellen gewonnene 2µm-DNS mit der Restriktionsendonuclease Pst I, so zeigte sich in keinem Experiment die nach S1-Behandlung zu erwartende "Schmierzunahme" unterhalb der dem linearen 6,3 kb langen Molekül entsprechenden Bande. Die Zunahme des "Schmiers", einer heterogenen Population gebrochener 2µm-Moleküle unterschiedlicher Größe, wäre eine Folge der S1-Nuclease-Reaktion mit Molekülen, die größere Bereiche modifizierter, paarungsunfähiger Basen (sog. "bulky lesions") enthalten.

In Abhängigkeit von der Dosis war nur eine Abnahme des Mengenanteils ungeschädigter 2 μ m-Plasmide feststellbar, die auf die Induktion von Doppelstrangbrüchen zurückzuführen ist, und die nach S1-Behandlung nicht größer war als vorher. Die 2 μ m-Bruchstücke manifestierten sich zusammen mit der chromosomalen DNS als niedermolekularer Schmier im unteren Gelbereich. Die Bestrahlung führte zur Induktion statistisch verteilter Brüche in der DNS und damit zu einem Molekülgemisch unterschiedlicher Größe.

Nach den anfangs angestellten Überlegungen sollten bei einer Bestrahlungsdosis von 10 kGy und einer Kopienzahl des 2 μ m-Plasmids von 100 Kopien/Zelle ungefähr 0.13 Doppelstrangbrüche/Molekül induziert werden. Gefunden wurden nach Bestrahlung mit 10 kGy 0.8 Doppelstrangbrüche/2 μ m-DNS, ermittelt aus den Densitogrammen der Autoradiogrammspuren, in denen die Pst I-linearisierte 2 μ m DNS sichtbar war. Obwohl also Gamma-Bestrahlung von (cir⁺) Zellen zu mehr Doppelstrangbrüchen im Supercoil führte als für das Kerngenom erwartet (was eventuell an einer niedrigeren Kopienzahl des 2 μ m-Plasmids liegen kann, die im verwendeten Stamm nicht bekannt ist), waren keine S1-Nuclease-sensitiven Stellen nachweisbar.

Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme bestätigte diese Ergebnisse. Eine Degradierung bestrahlter und linearisierter Moleküle durch die S1-Nuclease fand nicht statt, die Absorptionskurve über den distinkten Banden zeigt die typische Verteilung einer Gauß'schen Glockenkurve. Eine Zunahme des linearen Molekülanteils in bestrahlten, S1-verdauten Proben im Verhältnis zur gesamten aufgetrennten DNS Menge war nicht zu beobachten.

Bei den angewandten Bestrahlungsdosen findet man also keine S1-Nuclease-sensitiven Stellen im endogenen 2 μ m-Plasmid der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Vermutung liegt nahe, daß solch komplizierte und große Schäden, wie die S1-Nuclease-sensitiven Stellen, konformationsabhängig auftreten und daher in Supercoil-Plasmiden in der Zelle nicht induziert werden.

Teil III

UNTERSUCHUNG VON S1-NUCLEASE-SENSITIVEN STELLEN IM KERN-
GENOM DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE NACH IN VIVO-BE-
STRAHLUNG MIT GAMMA-STRAHLEN

1. EINLEITUNG

Es sollte nachgewiesen werden, daß im Chromatin des niederen Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* unter anoxischen Bedingungen (direkte Strahlenwirkung) durch Gamma-Strahlen S1-sensitive Stellen induziert werden, d.h. Basenveränderungen in der DNS, die zu lokaler Denaturierung und somit S1-Nuclease-Abbau führen. Durch den Vergleich von reparaturprofizienten Wildtypstämmen mit Mutanten, die unterschiedliche genetische Reparaturdefekte tragen, sollte geklärt werden, ob die S1-sites repariert werden können. Es war weiterhin von Interesse festzustellen, ob einer der drei in Hefe bekannten Reparaturwege für diese Schäden verantwortlich ist.

Zunächst sollte die Induktion von Doppelstrangbrüchen und S1-sites in einigen Chromosomen untersucht werden, denn im Gegensatz zu herkömmlichen Techniken erlaubt erstmals die OFAGE eine derartige Analyse des "Schicksals" einzelner Chromosomen. Es wurde die gamma-induzierte Schädigung eines großen im Vergleich zu einem kleinen Chromosom untersucht (s. 2.3.), zudem ein Stamm mit einem circulären Chromosom III (s. 2.2.). Dieses circuläre Chromosom wandert in der gepulsten Elektrophorese nicht in das Gel ein, wohl aber linearisiert nach Bruchinduktion. Es kann dann durch Southern-Hybridisierung sichtbar gemacht werden. Diese Degradierung ist besonders gut quantifizierbar.

Sodann galt es, Dosis-Effekt-Kurven für die gamma-induzierten Doppelstrangbrüche und S1-Nuclease-sensitiven Stellen im Gesamtgenom eines reparaturprofizienten Wildtyps und verschiedener Reparaturmutanten anzufertigen (s.2.4.).

Ein großer Aufgabenkomplex war der Frage gewidmet, ob die Induktion von S1-Nuclease-sensitiven Stellen stochastisch über das gesamte Genom verteilt oder in bestimmten Regionen spezifisch erfolgt (s. 2.5.). Die untersuchten Systeme, d.h. Genbereiche, unterschieden sich in Transkriptionsaktivität, Transposon-Insertionen, chromosomaler und plasmidaler Lokalisation. Hinweise für die unterschiedliche Schadenssetzung und genspezifische Reparatur in verschiedenen Genombereichen gibt es von Säugerzell-Analysen (Madhani et al. 1986; Hanawalt 1986; Bohr et al. 1986).

Zuletzt wurde die Frage nach der Reparatur von S1-Nuclease-sensitiven Stellen im Vergleich zu der von Doppelstrangbrüchen nach Liquid Holding Recovery (LHR) der bestrahlten Zellen in Puffer angegangen (s. 2.6.). Die Untersuchung des Verhaltens von Mutanten der Hefe, die Defekte in einem der drei epistatischen Reparaturkomplexe aufweisen, sollte Aufschlüsse über die Reparaturwege liefern, die die Zelle für die Reparatur von S1-Nuclease-sensitiven Stellen wählt. Auch hier erlaubte es die Technik der OFAGE erstmalig, die Schadenssetzung und Reparatur für unterschiedliche Chromosomen individuell zu analysieren.

2. ERGEBNISSE

2.1. Anwendung der OFAGE auf Sl-Nuclease-behandelte Lysate des reparaturprofizienten Wildtyps BKO

Zunächst sollte qualitativ die Auswirkung einer Bestrahlung der Zellen mit steigenden Dosen auf das elektrophoretische Bandenmuster im Gel mit und ohne Sl-Nuclease-Verdau untersucht werden. Dazu wurden Zellen des reparaturprofizienten Hefe-Stammes BKO mit unterschiedlichen Gamma-Dosen bestrahlt und direkt zu Lysaten weiterverarbeitet. Die 150 μ l-, Sl-behandelten Lysatblöckchen wurden im OFA-Gel aufgetrennt, das Gel wurde gefärbt, entfärbt und fotografiert (Abb. 24).

Abb. 24:

Auftrennung von Lysaten reparaturprofizienter Zellen, die nicht bestrahlt (A), bzw. mit 100 Gy (B), 200 Gy (C), 400 Gy (D), 800 Gy (E) bestrahlt worden waren und nach Inkubation unter Standard-Sl-Bedingungen ohne Nuclease Sl (-Sl) und mit Nuclease Sl (+Sl) in der OFAGE bei einer Pulsfrequenz von 50 Sekunden aufgetrennt wurden.

Das Densitogramm von Gel D steht stellvertretend für die von sämtlichen Gelphotonegativen angefertigten Densitogramme. Die Zahlen bezeichnen die Banden im Gel;

(1) - Nuclease Sl, (2) + Nuclease Sl

1

2

A



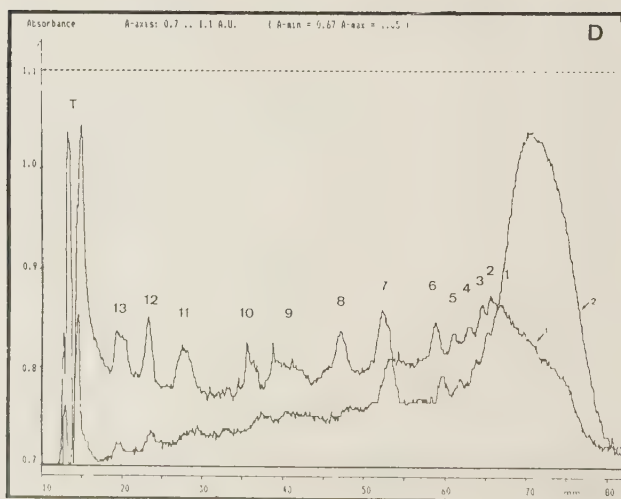
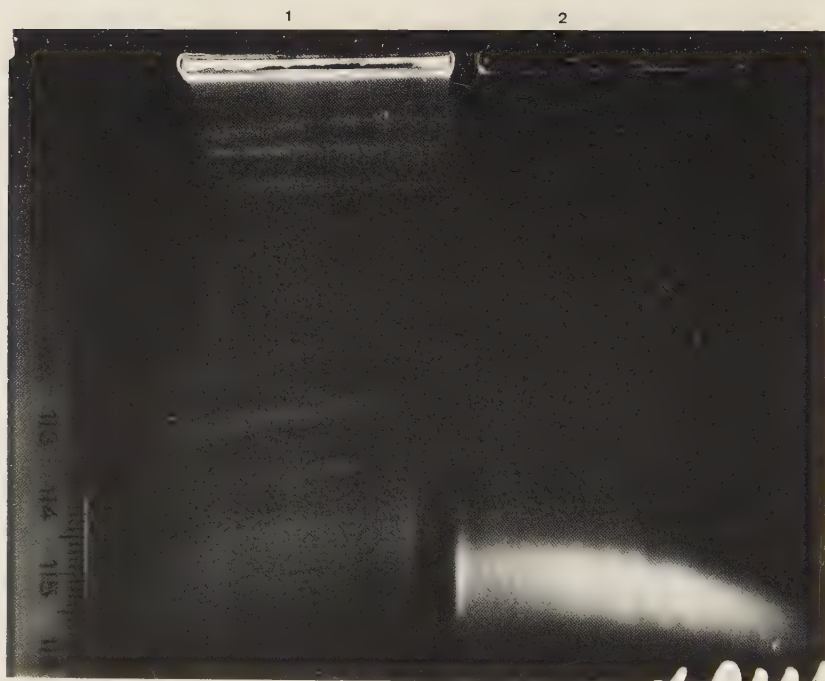
1

2

B



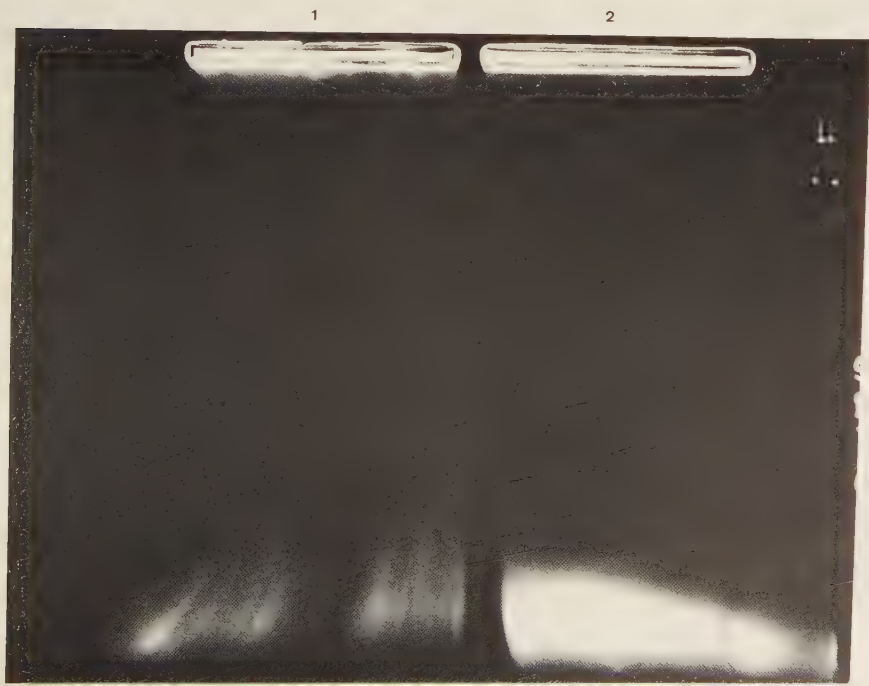
D



C



E



Densitometrische Auswertung der Gelfotonegative von Abb 24:

Sichtbar war eine Bandenintensitätsabnahme mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Die Bandenintensitätsabnahme der nicht mit S1-Nuclease verdauten Proben ist auf strahleninduzierte Doppelstrangbrüche zurückzuführen. Bei Bestrahlungsdosen von 1000 Gy und mehr ist jedes Molekül von einem ionisierenden Ereignis getroffen worden und daher geschädigt, weshalb im Gel keine Banden mehr sichtbar waren. Die gesamte Masse der DNS befand sich als "Schmier" im unteren Gelbereich. Enzymverdau der bestrahlten Proben mit S1-Nuclease führte zu einer Abnahme der Bandenintensität im Vergleich zur unbehandelten Probe, die mit steigender Bestrahlungsdosis zunahm. Die unbestrahlte Probe war nach S1-Verdau (innerhalb der Fehlergrenze) unverändert. Die Auflösungsgrenze lag bei etwa 1000 Gy, wo schon die unverdaute Probe keine Banden mehr zeigt (s. Abb. 4).

2.2. Analyse von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen am circulären Chromosom III

Circuläre DNS-Moleküle in Chromosomengröße wandern in der gepulsten Elektrophorese nicht in das Gel ein (Schwartz und Cantor 1984). Ein einzelner Doppelstrangbruch in einem circulären Chromosom führt jedoch zur Linearisierung des Moleküls und damit zu einem, ausschließlich seiner Länge entsprechenden Migrationsverhalten in der OFAGE. Dieses System eignet sich damit hervorragend zur Quantifizierung von Strahlenschäden, die mit oder ohne Enzymverdau zu Doppelstrangbrüchen führen. Aus diesem Grund wurde ein diploider Stamm JH1030, eine Konstruktion von J. Haber, die ein circuläres Chromosom III enthält, mit steigenden Gamma-Dosen bestrahlt, unter Standard-Sl-Bedingungen inkubiert und in der gepulsten Elektrophorese aufgetrennt. Das geblottete Gel wurde mit einer Zentromerprobe von Chromosom III, dem Plasmid YeCEN3-13 nach dem Protokoll von Southern (1975) hybridisiert und die Autoradiogramme (Abb. 25) per Densitometer ausgewertet (Abb. 26).

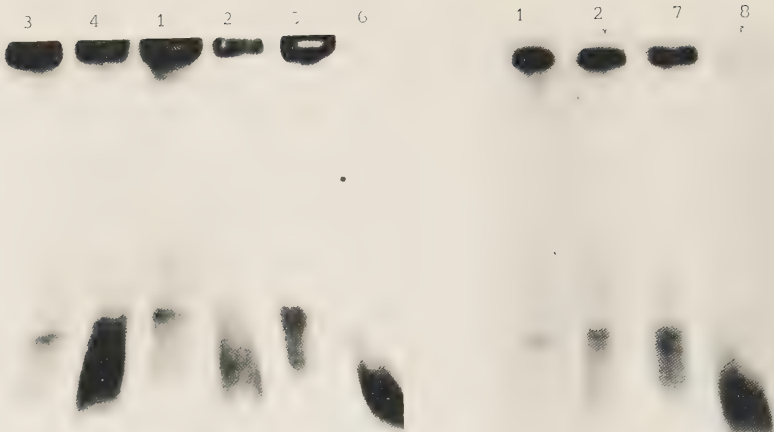


Abb. 25 a und b:

Autoradiogramme von Proben des Stammes JH1030 nach Gamma-Bestrahlung mit steigenden Dosen von 0 Gy (1,2), 200 Gy (3,4), 400 Gy (5,6) und 600 Gy (7,8), Auftrennung in der OFAGE und Hybridisierung der Filter mit einer CEN3-Probe. Die Proben waren unter Standard-S1-Bedingungen ohne Enzym (1,3,5,7) und mit S1-Nuclease (2,4,6,8) inkubiert worden.

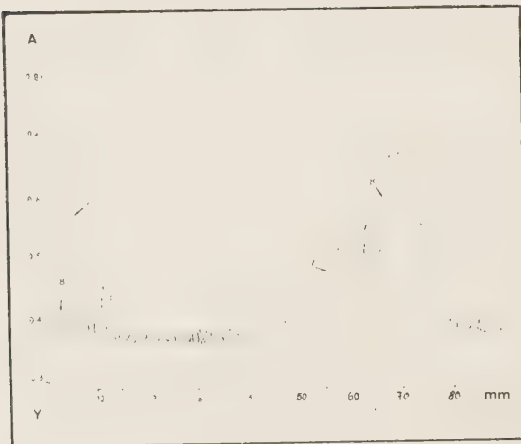


Abb. 26:
Densitogramm der in Abb. 25 dargestellten Autoradiogrammspur

DNS-Moleküle von Chromosom III, die nicht durch Bestrahlung mit oder ohne S1-Verdau linearisiert worden waren, lieferten ein Signal auf dem Filter, das dem Auftragungsort in der Tasche des Gels entspricht. Linearisierte Moleküle bandierten, wenn sie 1 Bruch/Molekül aufwiesen, als distinkte Bande im unteren Gelbereich. Bruchinduktion von mehr als 1 Bruch/Molekül führte zu einem niedermolekularen Schmier unterhalb der der ungebrochenen DNS von Chromosom III entsprechenden Bande auf dem Autoradiogramm.

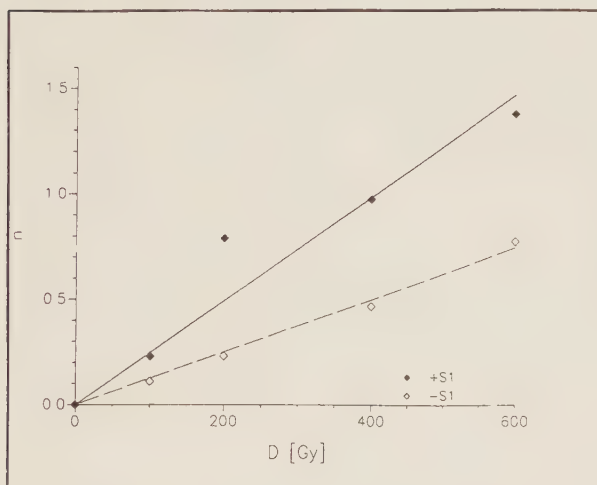


Abb. 27:

Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme von Abbildung 25 a und b lieferte die Berechnungsgrundlage der Regressionsgeraden, die die Dosis Effekt-Beziehungen am circularen Chromosom III darstellen. Aufgetragen wurden die experimentell ermittelten Brüche/Molekül (n) gegen die Dosis (Gy). Die gefüllten Symbole stellen das Ergebnis der S1-Nuclease-Behandlung dar.

n-S1 = Doppelstrangbrüche

n+S1 = Doppelstrangbrüche + S1-sites

Der Vergleich der Bestrahlungsdosen, die zu einer mittleren statistischen Bruchhäufigkeit von 0,5 Brüchen/Molekül führten, ergab ungefähr 400 Gy für Doppelstrangbrüche und ungefähr $(400 \text{ Gy} - 205 \text{ Gy}) = 195 \text{ Gy}$ für S1-Nuclease-sensitive Stellen, die damit ebenso häufig induziert wurden: bei Bestrahlung mit 200 Gy wurden 0.2 Doppelstrangbrüche und 0.28 S1-Nuclease-sensitive Stellen pro Molekül gefunden.

2.3. Verhalten unterschiedlich großer Chromosomen nach Bestrahlung und S1-Nuclease-Behandlung

Mit zunehmender Größe eines Moleküls nimmt bei gegebener Bestrahlungsdosis die Wahrscheinlichkeit zu, von einem ionisierenden Ereignis getroffen zu werden.

Ziel des im Folgenden dargestellten Experimentes war es, diesen Sachverhalt im vorliegenden System qualitativ zu beweisen. Lysate von unbestrahlten Zellen und solchen, die mit 200 Gy bestrahlt worden waren, wurden mit einer Pulsfrequenz von 50 und 10 Sekunden im OFA-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Hybridisierung mit pPM410 mit dem Gen SUP17 sollte das Verhalten des kleinen Chromosoms IX nach Bestrahlung und S1-Nuclease-Verdau darstellen, die mit pDP11, das ein Zentromer VII-Fragment trägt, das Verhalten des großen Chromosom VII.

Tatsächlich war die Degradierung des großen Chromosom VII nach Bestrahlung und S1-Nuclease-Behandlung, die sich als starker Schmier in den unteren Gelbereich hinein und einer Bandenintensitätsabnahme manifestiert, wesentlich stärker ausgeprägt als die des kleinen Chromosom IX (Abb. 28).

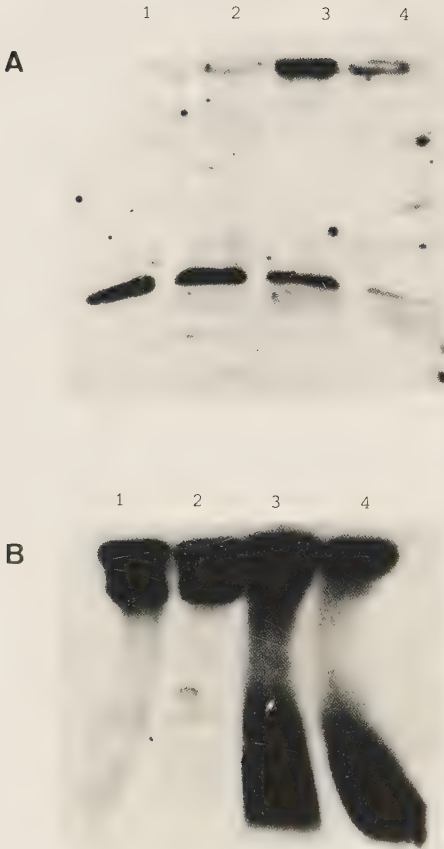


Abb. 28:

Autoradiogramme von OFA-Gelen, die Lysate von Zellen auftrennten, die nicht (1,2) bzw. mit 200 Gy (3,4) bestrahlt und unter S1-Bedingungen mit S1-Nuclease (2,4) und ohne S1-Nuclease (1,3) inkubiert worden waren. Die Hybridisierung mit einem SUP17-Plasmid zeigt Chromosom IX (A), die mit einem CEN7-Plasmid Chromosom VII (B).

2.4. Dosis-Effekt-Beziehungen von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen in verschiedenen Mutanten von *S. cerevisiae*

Es wurden verschiedene isogene Stämme von *S. cerevisiae* auf die Gamma-Induktion und Reparatur von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen untersucht, die sich in ihrem Reparaturverhalten von Gammastrahlen-induzierten Schäden unterscheiden.

Beim Stamm BK3 handelt es sich um einen diploiden Wildtyp bezüglich der Reparaturfähigkeit von Gamma-induzierten DNS-Schäden.

Der Stamm BK3 ist in der Exzisionsreparatur vor allem von UV-induzierten DNS-Läsionen geschädigt (Haynes und Kunz 1981). Der Stamm ist daher stark UV-sensibel und zeigt nahezu Wildtyp-Verhalten bei Röntgen- und Gamma-Bestrahlung.

BK18 weist eine Mutation im Allel RAD18-2 auf, das die sog. mutagene Reparatur kontrolliert. Der Stamm zeigt erhöhte Sensibilität gegenüber UV- und ionisierender Strahlung (Haynes und Kunz 1981; Siede und Eckardt 1984).

BK50 ist im Allel RAD50-1 mutiert, dessen Genprodukt eine Rolle in der Rekombinationsreparatur spielt (Game 1983; Siede et al. 1984). Der Stamm weist daher eine erhöhte Gamma-Empfindlichkeit auf (Haynes und Kunz 1981).

RS3 ist ein haploider reparaturprofizienter Hefe-Stamm. Dieser Stamm ist auf Grund der Tatsache, daß sein Genom in nur einfacher Kopie vorliegt, in stationärer Phase nicht in der Lage, Läsionen, wie z.B. gamma-induzierte Doppelstrangbrüche, zu reparieren, deren Reparatur Rekombinationsvorgänge erforderlich macht (Frankenberg-Schwager 1979). In logarithmischen haploiden Zellen, in denen replizierende Genome vorliegen, ist Reparatur hingegen möglich.

In den beschriebenen Mutanten sollte die Induktion von SI-Nuclease-sensitiven Stellen nach Gamma-Bestrahlung stationärer Zellen untersucht werden.

2.4.1. Überleben der einzelnen Reparaturmutanten nach Bestrahlung

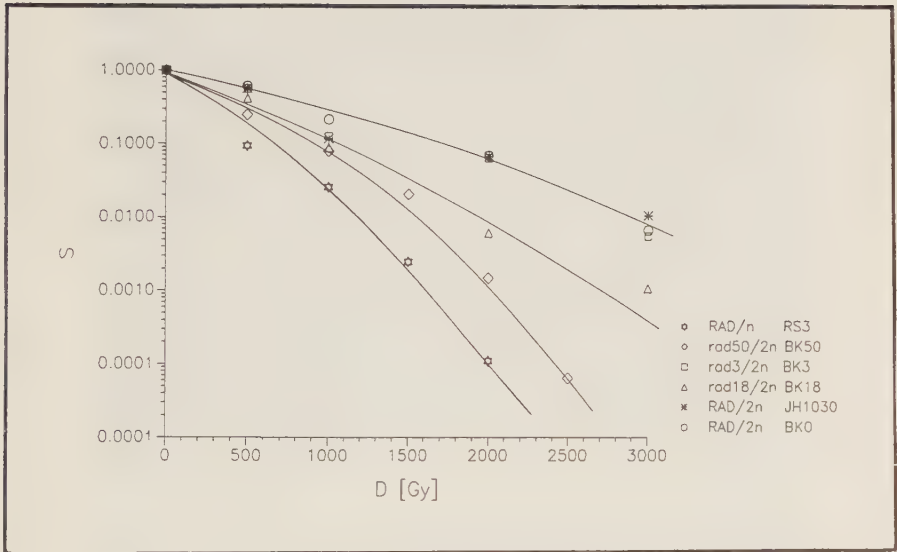
Nach Gamma-Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen wurde die Koloniebildungsfähigkeit der verschiedenen Stämme in Abhängigkeit von der Dosis auf Platte getestet. Die Mutanten unterschieden sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der ionisierenden Strahlung in der erwarteten, unter 2.4. angedeuteten Weise. (Abb. 29)

Abb. 29:

Überleben (S) der verwendeten Reparaturmutanten von *S. cerevisiae*, ermittelt aus der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nach Gamma-Bestrahlung in Stickstoffatmosphäre, aufgetragen gegen die verabreichten Gamma-Dosen (D).

Graphisch aus dem linearen Anteil der jeweiligen Überlebenskurven ermittelten Dosis D_0 , die den Anteil der Überlebenden auf 37 % reduziert:

D_0 RAD/2n, rad3/2n:	550 Gy
D_0 rad18/2n:	335 Gy
D_0 rad50/2n:	250 Gy
D_0 RAD/n:	250 Gy



Das Verhalten der Mutanten nach Bestrahlung in Stickstoff-Atmosphäre entspricht dem in der Literatur beschriebenen nach Bestrahlung in Luft (McKee und Lawrence 1980; Kunz 1981).

Die rad3-Mutante zeigte die gleiche Sensitivität gegenüber Gamma-Strahlung wie die Wildtyp-Stämme. Demgegenüber erwies sich die rad18-Mutante als etwas sensibler als der Wildtyp, jedoch deutlich resistenter gegen Gamma-Strahlen als die rad50-Mutante. Am sensibelsten verhielt sich der haploide Wildtyp-Stamm, infolge unterbleibender Reparatur.

2.4.2. Dosis-Effekt-Kurven für Doppelstrangbrüche und Sl-Nuclease-sensitive Stellen in verschiedenen Reparaturmutanten

Untersucht wurde das Auftreten von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen im Gesamtgenom der verschiedenen Reparaturmutanten in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte unter Stickstoff.

Um alle Moleküle zu erfassen, d.h. auch solche, die zusätzlich zu Sl-Nuclease-sensitiven Stellen Doppelstrangbrüche aufweisen, wurde jede Probe einem Gellauf mit kleiner Umschaltfrequenz (10 Sekunden) unterworfen. Dabei wurden die großen Moleküle im oberen Gelbereich "gestaucht", d.h. wenig separiert zugunsten einer höheren Auflösung der Molekülbruchstücke im unteren Gelbereich (Abb. 30).

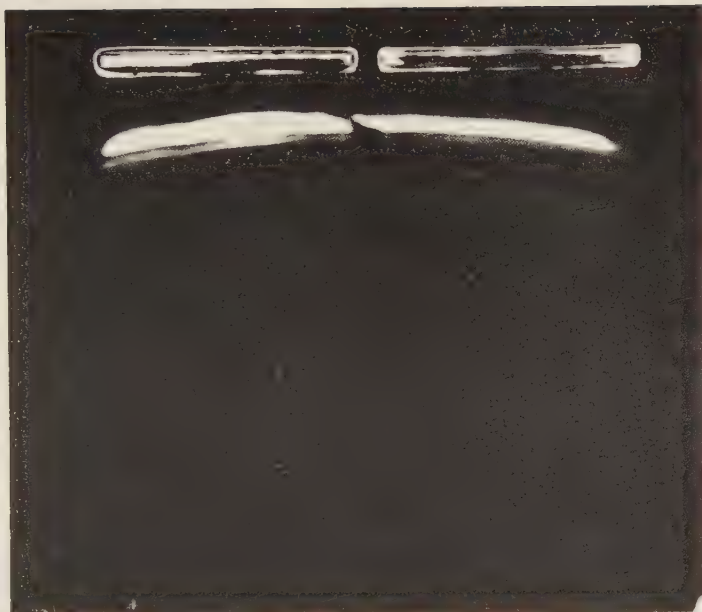
Abb. 30:

OFA-Gele, in denen Lysate unbestrahlter Zellen (a), mit 200 Gy (b) und mit 500 Gy (c) bestrahlter Zellen aufgetrennt worden waren bei einer pulsfrequenz von 10 Sekunden nach Inkubation unter Sl-Nuclease-Bedingungen mit (2) und ohne Sl-Nuclease (1).

1

2

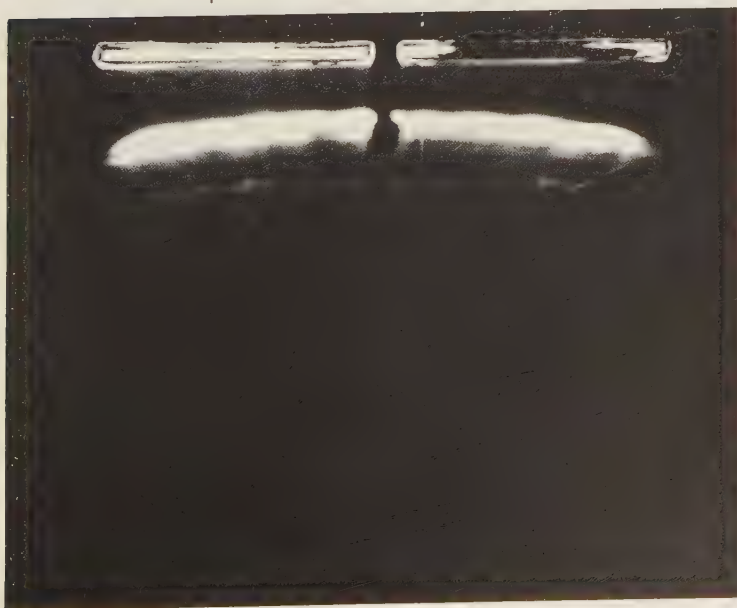
a



1

2

b



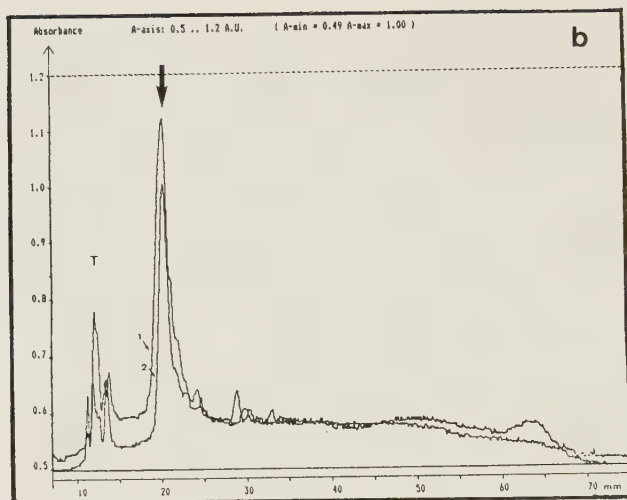


Abb. 31:
Das Densitogramm von Gel (b) steht stellvertretend für die von sämtlichen Gelphotonegativen angefertigten Densitogramme. Bezeichnung s. Abb. 30

Die Densitogramme, die von den Gelphotonegativen der in Abb. 28 gezeigten Gele angefertigt worden waren, wurden wie unter 2.1.4. in Teil I beschrieben ausgewertet: Der Anteil der ungebrochenen Molekülfraktion, d.h. des Peaks, der im Densitogramm in Abb. 31 mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, wurde ins Verhältnis zur gesamten DNS-Menge gesetzt.

Die Gesamt-DNS-Menge pro Gelspur setzt sich zusammen aus den gestauchten Banden, die im Densitogramm als relativ scharfer Peak erscheinen, und dem auf S1-Nuclease- und/oder strahleninduzierte Degradierung der DNS zurückgehenden niedermolekularen DNS-Schmier, der sich über einen großen Anteil des unteren Gelbereichs verteilt und daher im Densitogramm als an den Peak anschließenden "Schwanz" sichtbar wird. Als Grundlinie für die Flächenberechnung diente immer die Eigenschwärzung des Negativs. Dieser Auswertungsmodus sollte eine willkürliche Festlegung der Basislinie vermeiden.

Die Auswertung der Densitogramme lieferte eine Punkteschar für jede Bestrahlungsdosis. Für die graphische Darstellung (Abb. 32 a-d) wurden computerunterstützt Regressionsgeraden berechnet.

Es sollte darauf hingewiesen werden, daß bei der Durchführung der Versuche, die zur Erstellung der Kurven von Abb. 32 führten, Bestrahlungsdosen gewählt wurden, die deutlich im biologischen Bereich liegen, da sie selbst bei der höchsten verabreichten Dosis von 500 Gy ein Überleben von 10-90 % je nach Mutante gewährleisten. Damit liegt eine entsprechend niedrige Induktionsrate der Schäden vor, was die Fehlerrate bei der Quantifizierung auf bis zu 100 % ansteigen läßt. Entsprechend sollten die Unterschiede in den Verhältnissen Doppelstrangbrüche: S1-sites, die für die diversen Mutanten gefunden wurden (Tab. 2), als nicht signifikant angesehen werden.

Tab. 2:

Gemittelte Doppelstrangbrüche pro DNS-Molekül:

Nach Gamma-Bestrahlung der Zellen mit steigenden Dosen und Auftrennung des Genoms in der OFAGE mit einer Pulsfrequenz von 10 Sekunden ohne Enzymverdau bzw. nach Behandlung der Zell-Lysate mit Nuclease S1 wurde der Anteil der ungebrochenen DNS-Moleküle an der gesamten DNS-Menge pro Gelspur im Densitogramm der Gelphotonegative ermittelt und daraus die Bruchhäufigkeit berechnet.

n_{dsb} = gamma-induzierte Doppelstrangbrüche/Molekül
 n_{dsb+S1} = gamma- und S1-induzierte Doppelstrangbrüche/Molekül
 n_{S1} = S1-induzierte Doppelstrangbrüche/Molekül

$Q =$ Verhältnis Doppelstrangbrüche:S1 sites (Q_m =Mittelwert)

Dosis	n_{dsb}	n_{dsb+S1}	n_{S1}	Q
RAD/2n				
100	0.14	0.37	0.23	1.64
200	0.23	0.58	0.35	1.52
300	0.30	0.58	0.28	0.93
400	0.33	0.69	0.36	1.09
500	0.51	1.05	0.54	1.06
				Q_m 1.25
rad3				
100	0.05	0.19	0.14	2.8
200	0.24	0.64	0.40	1.67
400	0.29	0.88	0.59	2.03
				Q_m 2.17
rad18				
100	0.08	0.17	0.09	1.13
200	0.16	0.48	0.32	2.0
400	0.30	0.70	0.40	1.33
				Q_m 1.49
rad50				
100	0.07	0.21	0.03	0.43
200	0.16	0.32	0.16	1.0
400	0.24	0.57	0.33	1.38
				Q_m 0.94

Abb. 32:

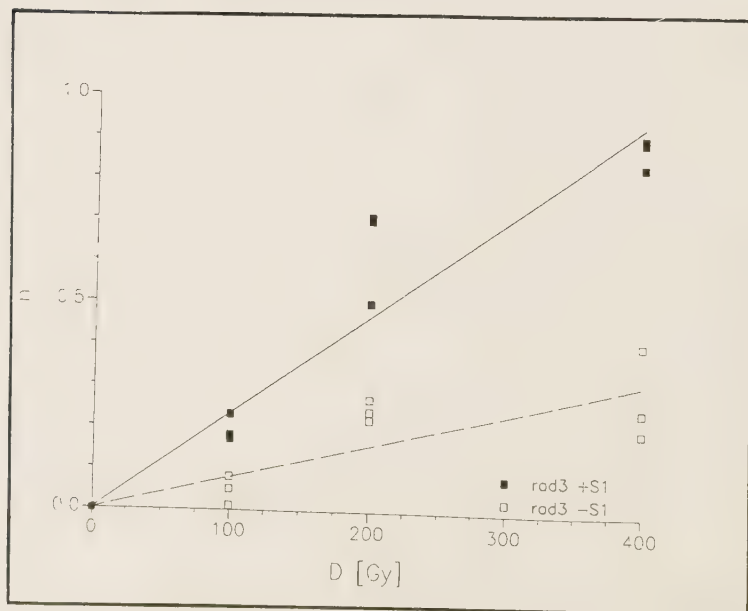
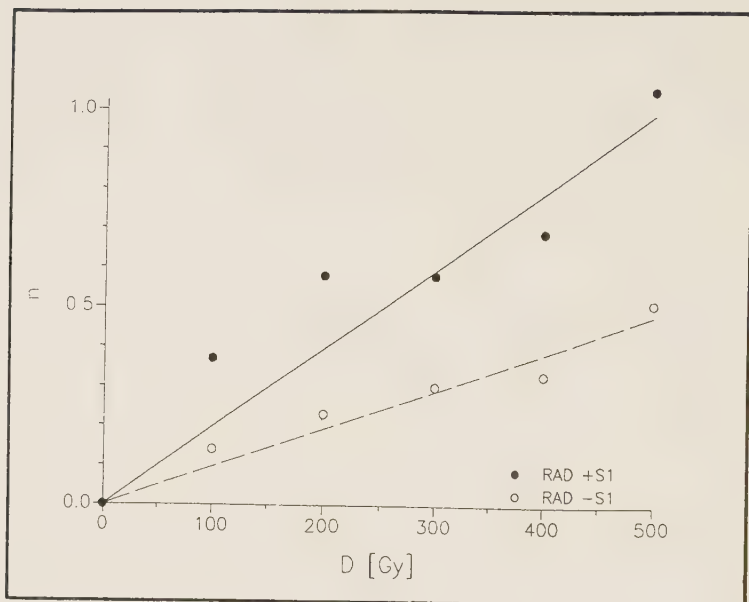
Dosis-Effekt-Beziehungen (strahleninduzierte Brüche/
Molekül aufgetragen gegen die verabreichte Gamma-Dosis)
von gamma-induzierten DNS-Schäden im Genom der verschie-
denen untersuchten Reparaturmutanten von *S. cerevisiae*:

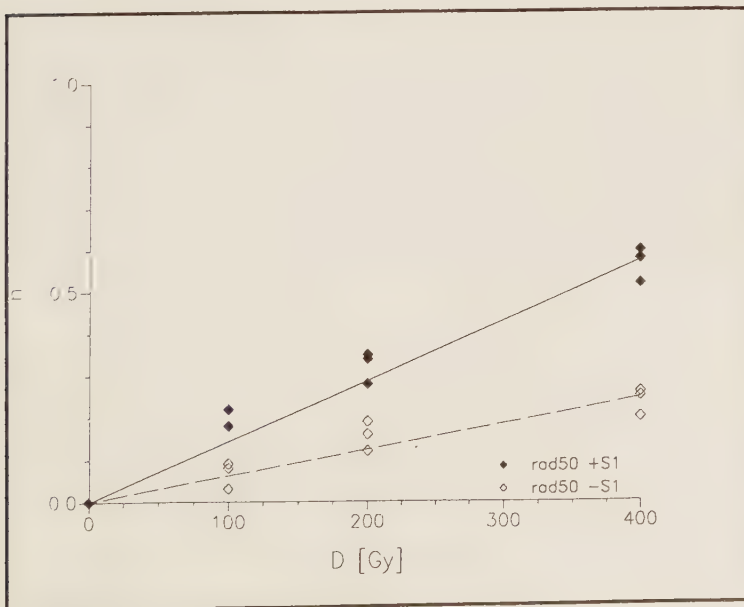
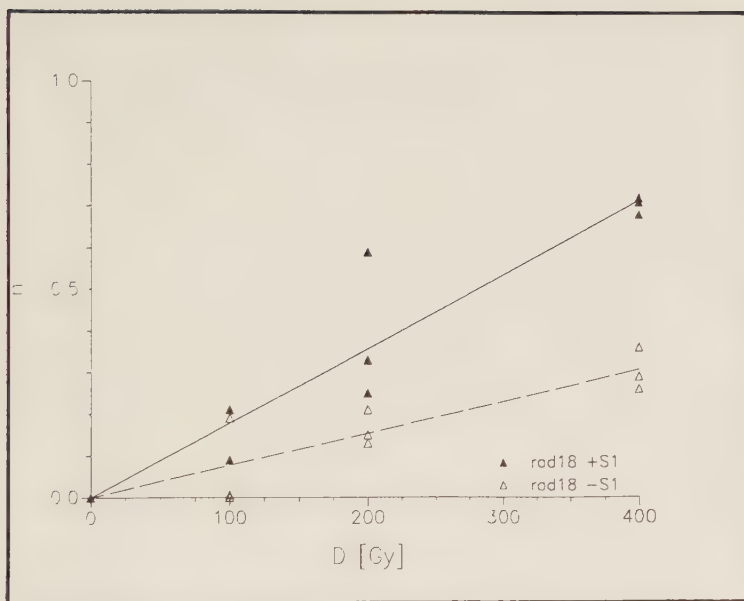
- a) diploider reparaturprofizienter Wildtypstamm (RAD)
- b) diploider rad3-Stamm
- c) diploider rad18-Stamm
- d) diploider rad50-Stamm

Die ohne Sl-Nuclease behandelten Proben (leere Symbole)
lieferten die Berechnungsgrundlage für die Regressions-
geraden, die die Gamma-Induktion von Doppelstrangbrüchen
darstellen, die mit Sl-Nuclease behandelten Proben (ge-
füllte Symbole) für die Regressionsgeraden, die die Gam-
ma-Induktion von Doppelstrangbrüchen und Sl-Nuclease
sensitiven Stellen darstellen.

(+Sl) = Doppelstrangbrüche + Sl-sites

(-Sl) = Doppelstrangbrüche





Der Vergleich der Steigungen der verschiedenen, berechneten Regressionsgeraden ermöglichte die graphische Ermittlung der Induktionshäufigkeit von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen in den verschiedenen Mutanten (Tab. 3):

Tab. 3:
Graphische Ermittlung der Anzahl der bei 200 Gy induzierten Sl-sites

$$n_{\text{Sl-sites}} = \frac{n(+\text{Sl}) - n(-\text{Sl})}{n(-\text{Sl})}$$

Stamm	$n_{\text{Sl-sites}}$
RAD/2n	1.1
rad3	2.2
rad18	1.3
rad50	1.4

Aus den Daten, die die nicht mit Sl-behandelten Proben lieferten, konnte die Induktion von Doppelstrangbrüchen nach Gamma-Bestrahlung belegt und quantifiziert werden. Die Proben, die mit Sl-Nuclease verdaut worden waren, zeigten die gamma-induzierten Doppelstrangbrüche sowie Sl-Nuclease-sensitiven Stellen auf. Die Differenzen der so ermittelten Daten lieferten die relative Häufigkeit, mit der gamma-induzierte DNS-Läsionen auftreten, die gegenüber einem Sl-Nuclease-Angriff sensitiv sind, bezogen auf die bei dieser Dosis induzierten Doppelstrangbrüche.

Die graphische Ermittlung der Häufigkeit, mit der Sl-Nuclease-sensitive Stellen bei 200 Gy induziert werden, ließ erkennen, daß sie sowohl im reparaturprofizienten Wildtyp als auch in den Reparaturmutanten 1 bis 2 mal so häufig induziert wurden wie Doppelstrangbrüche.

Die Dosis-Effekt-Beziehungen für Doppelstrangbrüche und SI-Nuclease-sensitive Stellen, die immer eine lineare Abhängigkeit zwischen Anzahl der Schäden und Dosis aufwiesen, bewegten sich bei allen Mutanten innerhalb des untersuchten Dosisbereichs in derselben Größenordnung, d.h. die Steigungen der berechneten Regressionsgeraden zeigten in etwa vergleichbare Werte.

Um Reparatur von Doppelstrangbrüchen und SI-Nuclease-sensitiven Stellen zu vermeiden, wurden die Zellen während der Bestrahlung in eiskaltem Phosphatpuffer gehalten, der keine Schutzwirkung gegenüber der Induktion dieser Läsionen oder der Zellabtötung ausübt (Frankenberg-Schwager et al. 1981).

Die in der Literatur mit 20 Doppelstrangbrüchen pro diploider Zelle angegebene Induktionshäufigkeit von Doppelstrangbrüchen im Wildtyp bei der Dosis D_0 (Frankenberg-Schwager et al. 1979) war vergleichbar mit dem hier ermittelten Wert von 17 Doppelstrangbrüchen/diploider Zelle im Wildtyp.

Zu bemerken ist, daß die densitometrische Auswertung der Ethidiumbromid-gefärbten OFA-Gele, in denen die bestrahlten Proben des reparatur-profizienten Wildtyp-Stammes aufgetrennt worden waren, dieselben Werte lieferte, wie die Auswertung der Autoradiogramme von OFA-Gelen, in denen der ebenso reparaturprofiziente Stamm JH1030 mit dem circulären Chromosom III aufgetrennt worden war.

2.5. Untersuchung einer site- oder locus-spezifischen Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen

Die Frage, ob Sl-Nuclease-sensitive Stellen nach Bestrahlung an definierten Stellen im Hefe-Genom auftreten, wurde mit der Methodik der "indirekten End-Markierung" angegangen. Diese sei an einem der durchgeführten Experimente als stellvertretendem Beispiel erklärt.

2.5.1. Untersuchungen am PHO5- und PHO3-Gen

Als Repräsentant für das gesamte Genom wurde ein 8kbp-großes EcoRI-Fragment auf Chromosom II gewählt, auf dem zwei Gene für das System der sauren Phosphatase, PHO3 und PHO5, liegen (Bergman 1986; Almer und Hörz 1986; Almer et al. 1986). Der Plasmid-Klon 4, das ein 0,76 kbp großes 5'-3' gerichtetes EcoRI-ClaI-Insert aus dem 8kbp-EcoRI-Fragment 5' vom PHO3 trägt, diente als Detektor für in dieser Region erfolgten Strangbrüche. Es markiert neben dem ungeschädigten 8kbp-EcoRI-Fragment alle jene DNS-Fragmente stromabwärts von der 5' EcoRI-Stelle, die durch Bruchinduktion verkürzt wurden. Die 5' EcoRI-Erkennungsstelle ist dabei der allen diesen Fragmenten gemeinsame Anfangspunkt.

Die aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen isolierte gesamtgenomische DNS wurde mit der Restriktionsendonuclease EcoRI nachgespalten, die Hälfte der Proben zur Erkennung von Einzelstrangbrüchen hitzedenaturiert und im Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Blotting auf Nitrocellulosefilter wurde mit dem ^{32}P radioaktiv markierten Plasmid Klon 4 hybridisiert.

Statistisch erfolgte Brüche bzw. die sich nach Sl-Behandlung als Doppelstrangbrüche manifestierenden Sl-Nuclease-sensitiven Stellen sollten zu einem Schmier unterhalb der charakteristischen 8kbp-Bande führen.

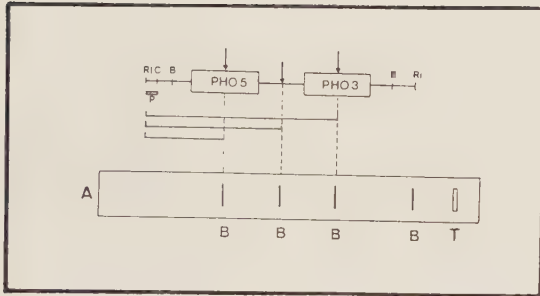


Abb. 33:

Nicht maßstabsgetreue Skizze, die das Prinzip der indirekten End Markierungs-Methode am Beispiel von PHO5 verdeutlichen soll. Dargestellt ist die theoretische Erwartung für sequenz-spezifisch induzierte S1-Nuclease-sensitiven Stellen im PHO5-Bereich des Chromosom II, die nach DNS-Isolierung, S1-Verdau, Auftrennung der gesamten genomischen DNS im Agarosegel und Southern-Hybridisierung mit der Hybridisierungsprobe in einem diskreten Bandenmuster im Autoradiogramm resultieren sollte.

A=Spur im Autoradiogramm

B=Bande im Autoradiogramm

P=Hybridisierungsprobe, in diesem Fall das Plasmid "Klon 4"

RI, C, B=Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI, ClaI, BamHI

T=Auftragungsort der Proben im Gel

Die Pfeile markieren Doppelstrangbrüche, die auf S1-Incision zurückgehen.

Wie zu erwarten war, führt Bestrahlung ab ca. 10 kGy zu einer signifikanten statistischen Verteilung von Doppelstrangbrüchen, erkennbar an einem ausgeprägten Schmier unterhalb der 8kbp-Bande. Sl-Behandlung veränderte weder Ausprägung noch Lokalisierung dieses Schmiers (Abb. 34). Ein Bandenmuster im Autoradiogramm war nicht zu erkennen. Dieses Ergebnis läßt sich dahingehend interpretieren, daß selbst bei derart hohen Dosen wie den applizierten 100 kGy in dem 8kbp-Bruchstück, das die Gene PHO3 und PHO5 trägt, keine Sl-Nuclease-sensitiven Stellen induziert wurden. Theoretisch müßten bei einer Dosis von 100 kGy ca 1-2 Sl-Nuclease-sensitive Stellen pro 8 kbp-Fragment induziert werden, wenn man von den im Zuge dieser Untersuchung erhaltenen Werte für die Häufigkeit der Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen ausgeht. Das läßt die Voraussage einer gewissen Spezifität für die Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen zu, deren Existenz im Hefegeom nach Gamma-Bestrahlung mit Hilfe der OFAGE nachgewiesen wurde (s. 2.4.2.), einer Methodik, deren Auflösungsgrenze unterhalb von 0.5 Brüchen/Molekül liegt, also sehr empfindlich ist. Die Sl-sites scheinen demnach nur innerhalb bestimmter Bereiche im Genom aufzutreten.

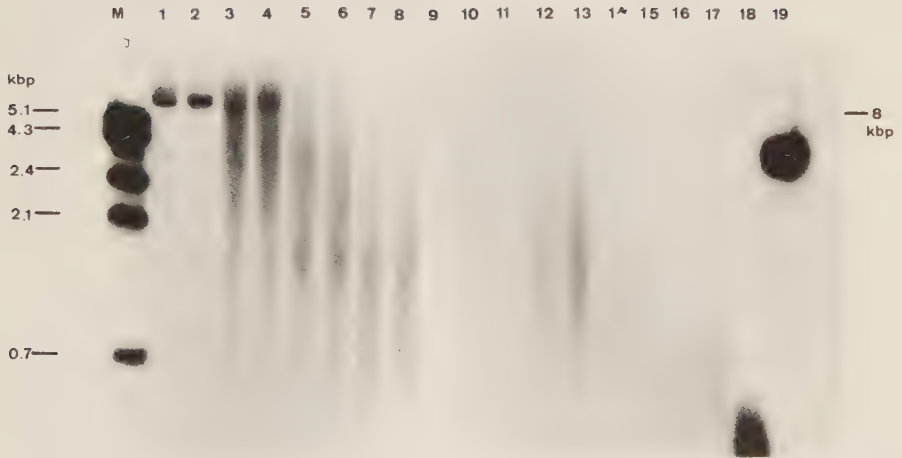


Abb. 34:

Autoradiogramm eines indirekten End-Markierungs-Experimentes von bestrahlten Wildtypzellen, die in phosphathaltigem Medium gewachsen waren, mit Klon 4 Gesamtgenomische DNS aus unbestrahlten (1,2,9,10,11) und mit 30 kGy (3,4,12,13), 60 kGy (5,6,14,15) und 90 kGy (7,8,16,17) bestrahlten Zellen wurde nativ (1-9) und hitzedenaturiert (10-17) nach Inkubation unter S1-Bedingungen ohne S1 (1,3,5,7,10,12,14,16) und mit S1 (2,4,6,8,11,13,15,17) im Agarosegel aufgetrennt und mit Klon 4 hybridisiert; Klon 4 wurde, verdaut mit EcoRI, PstI, ClaI, AvaI, als Längenstandard aufgetragen. M13-Einzelstrang-DNS, inkubiert mit S1 (18) und ohne S1 (19) diente der Kontrolle des Verdaus.

Es sollte die Abhängigkeit der Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen nach Gamma-Bestrahlung von der Transkriptionsaktivität bestimmter Gene geprüft werden. Es wäre nämlich denkbar, daß Sl-Nuclease-sensitive Stellen im Genbereich des PHO5 deshalb nicht gefunden wurden, weil das Gen unter den verwendeten, die saure Phosphatase nicht induzierenden Anzuchtbedingungen nicht transkribiert ist. Bekannt ist, daß die Nucleosomenanordnung unterschiedlich ist, je nachdem ob ein Gen transkribiert wird oder nicht (Mathis et al. 1980; Cartwright et al. 1982; Igo-Kemenes et al. 1982; Weintraub 1980 und 1985; Elgin 1981). Dies könnte Auswirkungen auf die Bildung denaturierter ungepaarter DNS-Bereiche nach Gamma-Bestrahlung haben.

Daher wurde die Prozedur wiederholt, nachdem die saure Phosphatase in Phosphatmangelmedium induziert worden war. Hierzu wurden Zellen des reparaturprofizienten Wildtyp-Stammes in einem Medium niederen Phosphatgehaltes bis zur stationären Phase angezogen. Die Induktion des Enzyms wurde mittels eines Aktivitätstests für die saure Phosphatase, die von den Zellen ins Medium sezerniert wird, überprüft (Meyhack et al. 1982). Der Test beruht auf der Spaltung von farblosem p-Nitrophenolphosphat durch die saure Phosphatase, wobei Phosphat und p-Nitrophenol entsteht, das in alkalischer Lösung in seiner gelb gefärbten chinoiden Form vorliegt. Die Extinktion als Ergebnis der Absorptionsmessung, die demgemäß bei 410 nm erfolgt, ist ein Maß für die Aktivität der sauren Phosphatase. Die derart induzierten Zellen wurden in phosphatfreiem Medium (0,1 M Tris/HCl pH 7,5) unter Stickstoffatmosphäre bestrahlt. Die weiteren experimentellen Schritte erfolgten wie bereits beschrieben.

Die optische und densitometrische Auswertung des in Abb. 35 dargestellten Autoradiogramms ließ eine Zunahme und Verlagerung des unterhalb der 8 kbp-Bande auftretenden Schmiere in der Spur erkennen, in der die mit 100 kGy bestrahlte und mit S1-Nuclease behandelte Probe aufgetrennt wurde, im Vergleich zu der mit der gleichen Dosis bestrahlten, aber nicht mit S1-Nuclease behandelten. Dies wird als Hinweis für das Auftreten von S1-Nuclease-sensitiven Stellen im 8 kbp-großen DNS-Bereich um das transkribierte PHO5-Gen gewertet. Eine Sequenzspezifität für die Induktion derartiger Basenschäden, die von der Nuclease S1 erkannt werden, schien nicht vorzuliegen, was aus dem Fehlen distinkter Banden geschlossen wurde. Die Schädigung von Basen nach Gamma-Bestrahlung, die zu geclusterten Läsionen führt, erfolgte offenbar statistisch verteilt. Denkbar wäre jedoch auch, daß in einem größeren denaturierten DNS-Bereich die Incision der S1-Nuclease verschieden häufig erfolgte und so eine heterogene DNS-Fragment-Population erzeugt wurde. Bei diesen Bereichen kann es sich nicht um ungeschädigte AT-reiche Regionen handeln, deren schwach ausgeprägter Wasserstoffbrücken-Bindungscharakter ein sog. "Atmen" beobachten läßt, da sonst auch in der unbestrahlten Kontrolle ein derartiger Schmier sichtbar werden müßte, was jedoch nicht der Fall war.

Die dritte Erklärungsmöglichkeit, die das Auftreten eines Schmiere statt distinkter Banden zuließe, wäre eine sequenzspezifische primäre Schadenssetzung an einer oder mehreren Basen, gefolgt von einer unspezifischen, unterschiedlich ausgeprägten sterischen Ausdehnung.

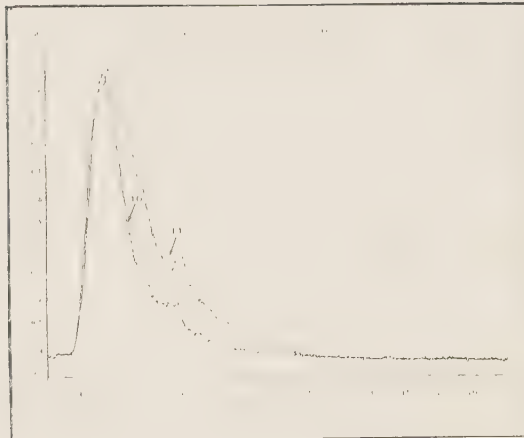
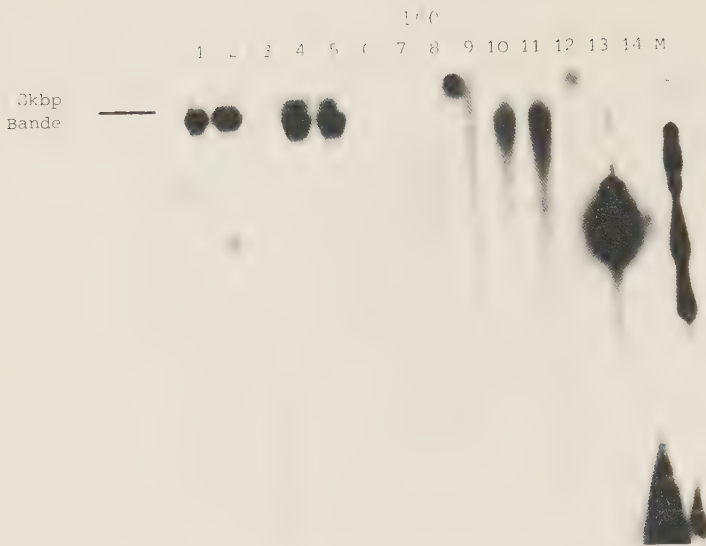


Abb. 2

Autoradiogramm eines indirekten End-Markierungs-Versuchs mit bestrahlten Wildtyp-Zellen, die in Medium mit sehr niedrigem Phosphatgehalt gewachsen waren. DNS aus unbestrahlten (1,2,12), mit 10 kGy (4,5,9), 50 kGy (6,7,8) und 100 kGy (3,10,11) bestrahlten Zellen wurde unter S1-Bedingungen ohne S1-Nuclease (1,4,7,10) und mit S1-Nuclease (2,5,8,11) inkubiert bzw. hitzedenaturiert (3,6,9,12). Mit (14) und ohne (13) S1-Nuclease inkubierte M13-DNS diente als Kontrolle für den S1-Verdau, die mit EcoR I, EcoR I/Ava I, EcoR I/Cla I und EcoR I/Pst I gespaltene Plasmid-DNS Klon 4 als Längenmarker. Das Densitogramm zeigt die Spuren 10 und 11.

2.5.2. Analyse des ADH2-Gens

Die Frage, ob die Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen abhängig ist von der Transkriptionsaktivität einer DNS-Region, wurde noch an einem zweiten System untersucht, dem Gen, das für die Alkoholdehydrogenase (ADH) II in Hefe kodiert. Hefe enthält drei Isoenzyme der Glucose-reprimierbaren ADH, die sich in ihrem elektrophoretischen Verhalten unterscheiden (Ciriacy 1975b). Die konstitutiv in der Zelle vorhandene ADH I scheint in erster Linie in der Gärung eine Rolle zu spielen (Williamson et al. 1981), die ADH II wird bei der Ethanolveratmung benötigt (Williamson et al. 1981). Das dritte Isoenzym ist in Mitochondrien lokalisiert (Williamson et al. 1981). Drei getrennte Gene kodieren für diese drei Isoenzyme (Ciriacy 1975a und 1975b). In Gegenwart von Glucose im Medium ist die ADH II reprimiert, dereprimiert jedoch bei Vorhandensein von nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol (Williamson et al. 1981). Verschiedene genetische Loci wurden identifiziert, die in die Regulation der Expression des ADH2-Gens eingebunden sind (Ciriacy 1979).

Die eingangs erwähnte Fragestellung wurde angegangen, indem Zellen des Stammes WV36-10a, der das Single Copy-Plasmid YCp50-22a enthält, in glucosehaltigem Vollmedium bis zur stationären Phase angezogen wurden. Die Kultur wurde geerntet, gewaschen, die eine Hälfte in glucosefreiem Vollmedium mit Glyzerin und Ethanol als Kohlenstoffquelle, die andere in YPD-Medium (das 2% Glukose enthält) für weitere 6 Stunden geschüttelt. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bestrahlt, die isolierte BamH I-verdaute DNS im Gel aufgetrennt, geblottet und gegen ein 0,6 kbp-großes BamH I/Sac I-Fragment des Plasmids Bsa hybridisiert. Dieses markierte im Autoradiogramm zum einen eine vom Zentromerplasmid YCp50-22a stammende, 2,2 kbp-große BamH I-Bande, auf der das plasmidale ADH2-Gen liegt; zum anderen eine 8 kbp-große Bande, die chromosomalen Ursprungs ist.

Es zeigte sich, daß sich selbst nach Bestrahlungsdosen von 100 kGy der Massenanteil der plasmidalen Bande, bezogen auf die Gesamt-DNS-Menge nach S1-Verdau nicht, oder nur sehr schwach veränderte. Dies bestätigte das bei der Untersuchung der 2µm-DNS erhaltene Ergebnis, daß Plasmide - wohl aufgrund ihrer Supercoil-Konformation - eine Schadensausweitung der strahleninduzierten Primärläsion zu geclusterten und damit für die S1-Nuclease-sensitive Stellen nicht zulassen, unabhängig von ihrem Transkriptionszustand.

Dagegen zeigte die doch deutlich ausgeprägte Abnahme des Massenanteils der chromosomalen 8 kbp-BamH I-Bande nach S1-Verdau bei der mit der höchsten Dosis von 100 kGy bestrahlten Probe eine Induktion von S1-Nuclease-sensitiven Stellen, jedoch sowohl im reprimierten als auch im dereprimierten Gen der ADH2.

2.5.3. Einfluß von Transposons auf die Induktion von S1-sites in bestimmten Genen

Ob ein von einem Transpositionseignis "angeschaltetes" Gen einen Zielort für die gamma-induzierten Schäden, die von der S1-Nuclease erkannt werden, darstellen, wurde in Stämmen getestet, die neben dem chromosomalen ADH4-Gen ein ADH4-haltiges Zentromerplasmid (ein Derivat des YCp50) besitzen. Dieses Gen zeigt im Wildtypstamm keinen Phänotyp, es handelt sich um ein sog. "stilles" Gen (Williamson et al. 1981). Springt jedoch ein Hefe-Transposon "Ty" in den Promotorbereich des Gens, so wird es exprimiert.

Auch diese Konstruktionen wurden dem schon beschriebenen Versuchsprotokoll unterzogen, wobei als Hybridisierungsprobe für die EcoR I-gespaltene DNS ein 0,7 kbp-großes BamH I/EcoR I-Fragment des Plasmids pYA4-2 verwendet wurde.

Sl-Behandlung der Proben führte auch nicht im Falle der höchsten Bestrahlungsdosen zu einer Veränderung des Schmiere unterhalb der Banden, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß Sl-Nuclease-sensitive Stellen in beiden Fällen nicht induziert worden waren, also weder im ADH4-Wildtypgen noch im ADH4::Ty-Gen.

2.5.4. Untersuchung der Zentromerregion

Zuletzt wurden die Zentromerregionen von Chromosom IV und VI untersucht, deren spezifische, nicht zufällige Nucleosomenanordnung (Mann und Davis 1986) Anlaß gab für die Analyse einer spezifischen Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen.

Der Stamm WV36-201 enthält das Zentromerplasmid YCp50-3a-22 mit dem Zentromer IV mit einer Kopie pro Zelle. Restriktionsverdau der gesamtgenomischen DNS dieser Zellen und Southern-Hybridisierung mit einer 0,7 kbp großen Hpa I/Xho I-Fragment des Plasmids YCp50 lieferte eine 11 kbp große Bande im Autoradiogramm, die auf die Linearisierung des Plasmids mit Xho I zurückgeht, und eine 2 kbp-große Bande, die die Zentromerregion von Chromosom IV umspannt.

Selbst nach Bestrahlung mit 100 kGy wiesen weder die 11 kbp-Bande noch die 2 kbp-Bande der mit Sl-Nuclease behandelten Proben eine Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Probe auf. Dies stellte zum einen wiederum eine Bestätigung des Versuchsergebnisses dar, das die Analyse des 2µm-Ringes ergab. Zum anderen ließ das Ergebnis die Aussage zu, daß die Zentromerregion unempfindlich gegenüber der Induktion von Sl Nuclease sensitiven Stellen ist.

Dieses Resultat konnte durch eine zusätzliche Untersuchung der Zentromerregion VI verifiziert werden, wobei die aus den bestrahlten Zellen isolierte DNS mit Hind III gespalten, im Gel aufgetrennt und mit einem 1,6 kbp-großen Hind III-Fragment des Plasmids pLA433

hybridisiert wurde. Allenfalls konnte hier in der Gelspur, in der die mit der höchsten Dosis bestrahlte Probe nach S1-Verdau aufgetrennt worden war, eine leichte Verschiebung des Schmiere in den unteren Gelbereich hinein festgestellt werden, die für eine geringe Sensitivität dieser DNS-Region gegenüber der Bildung von Läsionen spricht, die ein Target für die S1-Nuclease darstellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in Teil II und Teil III beschriebenen Versuche als Hinweise gewertet werden können, daß S1-Nuclease-sensitive Stellen in gewissen Chromatinbereichen durch Gamma-Strahlen nicht induziert wurden, abhängig von der DNS-Konformation (z.B. Supercoil), der Nucleosomenanordnung und vielleicht noch zusätzlichen, bis jetzt noch unbekannten Parametern, wie z.B. methylierte Basen oder Übergänge von der B- zur Z-Form der DNS (Pulleyblank et al. 1985; Singleton et al. 1984). Gegen eine rein statistische Verteilung sprechen die Befunde, daß in bestimmten Regionen (nicht transkribiertes PHO5-Gen, Zentromer IV und VI) keine S1-sites induziert wurden, obwohl sie bei statistischer Verteilung erwartet werden könnten.

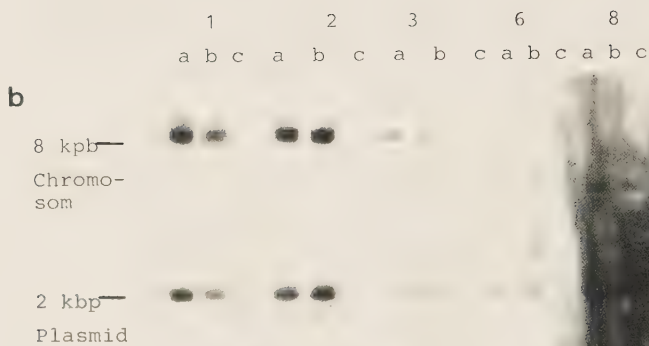
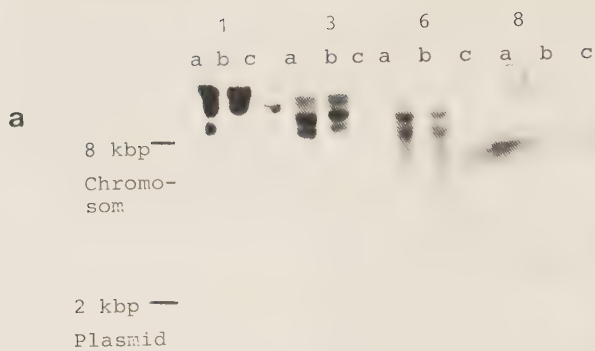
Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen in Hefe werden in gamma-bestrahlter Lambda-DNS weder Doppelstrangbrüche noch S1-sites in bestimmten DNS-Sequenzen bevorzugt induziert. Die im Phagenkopf verpackte Lambda-DNS scheint über ihre gesamte Länge gleichmäßig gegenüber der direkten Strahlenwirkung sensitiv zu sein (Junker et al. 1984).

Abb. 36:

Autoradiogramme der verschiedenen, mit Hilfe der indirekten End-Markierung untersuchten Genbereiche:

- (a) ADH2, nicht induziert, nach BamH I-Verdau der DNS
- (b) ADH2, induziert, nach BamH I-Verdau der DNS
- (c) ADH4, Wildtypgen, nach EcoR I-Spaltung der DNS
- (d) ADH4, mit Ty-Insert, nach EcoR I-Spaltung der DNS
- (e) CEN4, nach Xho I-Verdau der DNS
- (f) CEN6, nach Hind III-Spaltung der DNS

Die Proben stammten aus unbestrahlten Zellen (1), mit 1000 Gy (2), 10000 Gy (3), 30000 Gy (4), 40000 Gy (5), 50000 Gy (6), 60000 Gy (7) und 100000 Gy (8) bestrahlten Zellen. Es wurde jeweils das zur Southern-Hybridisierung verwendete Plasmid nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen als Längenmarker und Positivkontrolle mit auf das Gel aufgetragen. Die Proben waren ohne S1-Nuclease (a), mit S1-Nuclease (b) bei 37°C bzw. ohne Enzym 5 Minuten bei 100°C (c) inkubiert worden.



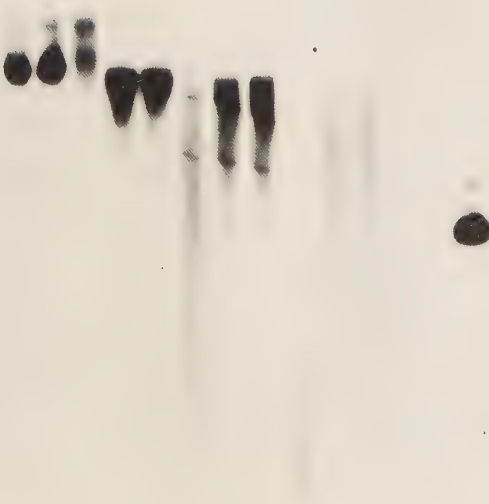
1 3 6 8
a b c a b c a b c a b c M

c



1 3 6 8
a b c a b c a b c a b c M

d



e

1 2 3 10 6 8
a b c a b c a b c a b c a b c

M

11 kbp
Plasmid

2 kbp
Chromo-
somal

1 2 3 4 5 7 8
a b c a b c a b c a b c a b c a b c a b c

M

Chromosomal

f

2.6. Analyse von Reparaturprozessen der Sl-Nuclease-sensitiven Stellen

Reparatur von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen unter Nichtwachstumsbedingungen

Die mit 200 Gy in Stickstoffatmosphäre bestrahlten Zellen der verschiedenen Mutanten wurden anschließend sofort auf Eis mit EDTA auf eine Konzentration von 0,1 M gebracht, um unkontrollierte Reparaturvorgänge zu unterbinden. Sodann wurden sie nach einem Waschvorgang für 0,4,8,16,24, Stunden bei 28°C im Schüttelwasserbad in Phosphatpuffer gehalten und jeweils sofort zu Lysaten verarbeitet.

2.6.1. Überlebenskurven

Gleichzeitig mit der Entnahme von Zellen für die elektrophoretische Strangbruchanalyse wurden Aliquots der Zellsuspension auf YPD-Platten ausplattiert und die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nach Bestrahlung und Inkubation in Puffer, die ein sog. "Liquid Holding Recovery" ermöglichen sollte, getestet.

Während des Liquid Holdings stattfindende Reparatur- und Genkonversionsereignisse sind mehrfach beschrieben worden (Eckardt et al. 1978; Ferguson und Cox 1980; Kunz 1981; Frankenberg-Schwager et al. 1980).

Wie erwartet, nahm die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung und Inkubation in Puffer mit der Inkubationszeit im Falle der reparaturprofizienten Wildtyp Stämme und des rad3-Stammes zu, was auf Reparaturvorgänge von Doppelstrangbrüchen in Puffer zurückgeführt wurde (Frankenberg-Schwager et al. 1979), die als letale Ereignisse betrachtet werden (Frankenberg-Schwager et al. 1979). Aus diesem Grunde zeigten auch die rad50-Mutante und der Haplont, die die Fähigkeit zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen verloren haben, keinen Erholungseffekt.

Da die Bestrahlung mit einer für Hefe sehr geringen Dosis erfolgte, wirkten sich Schwankungen so stark aus, daß das Überleben der rad50-Mutante und des haploiden Wildtyps nach Bestrahlung mit 200 Gy um etwa 10 % über dem der übrigen untersuchten Mutanten zu liegen kam. Dies muß als Zufallsergebnis gewertet werden, das im Einklang steht mit der gefundenen leicht erhöhten Schadensinduktion in diesen Mutanten.

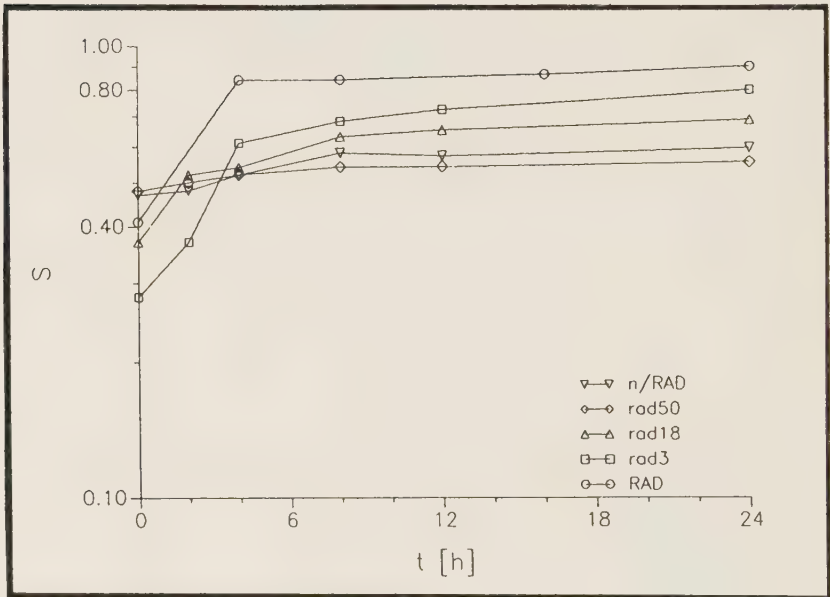


Abb. 37:
Überlebenskurven für die verschiedenen Reparaturmutanten als Funktion der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nach unterschiedlichen Zeiten der Inkubation in Puffer (LHR); die Bestrahlung mit 200 Gy erfolgte in Stickstoffatmosphäre

2.6.2. Strangbruchanalyse mit Hilfe der OFAGE nach Liquid Holding Recovery

Die gelelektrophoretische Separierung der einzelnen Chromosomen im Agarosegel ermöglichte es, das Schicksal der DNS der verschiedenen Chromosomen während der Inkubation in Puffer separat zu verfolgen.

Es wurden die schon beschriebenen Reparaturmutanten in der OFAGE untersucht, deren elektrophoretische Karyotypen einige Unterschiede aufwiesen (Abb. 38). Eine sichere Korrelierung Bande - Chromosom wäre nur nach Southern-Hybridisierung aller Chromosomen möglich, was im Zuge dieser Arbeit nicht ausgeführt wurde. Als Anhaltspunkt für die Bandenzuordnung diente der Stamm AB972 (Carle und Olson 1984), dessen Banden-Chromosomen-Zuordnung bereits erfolgte (Carle und Olson 1984).

Abb. 38:

Elektrophoretische Karyotypen der verwendeten Mutanten:

- (a) BK0 (RAD/2n)
- (b) RS3 (RAD/n)
- (c) BK3 (rad3/2n)
- (d) BK18 (rad18/2n)
- (e) BK50 (rad50/2n)
- (f) AB972

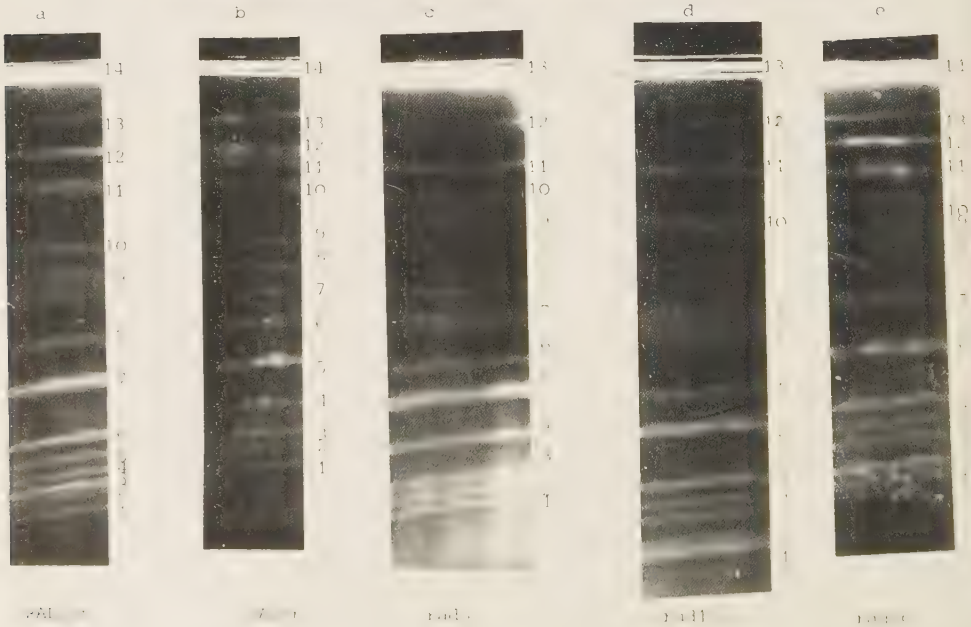
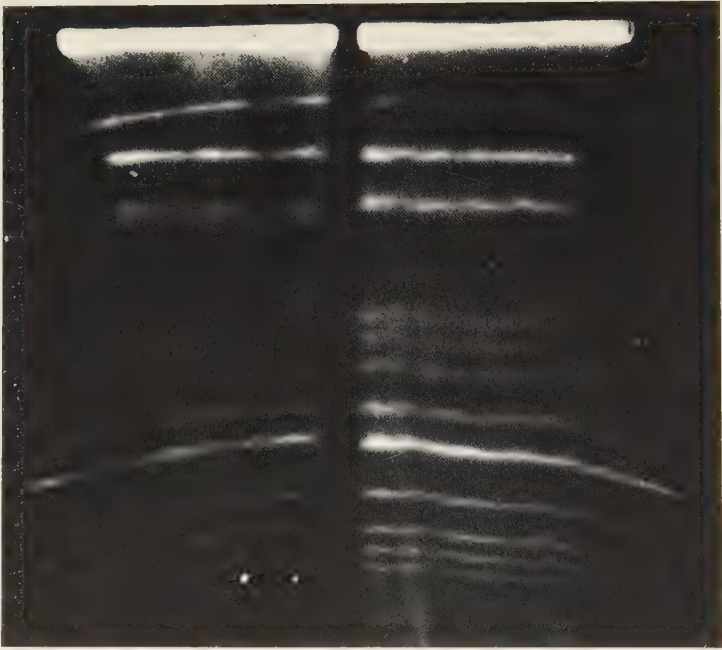
Die römischen Ziffern geben die Chromosomen an, wie sie für den Stamm AB972 bekannt sind, die arabischen Ziffern die Bandennummerierung.

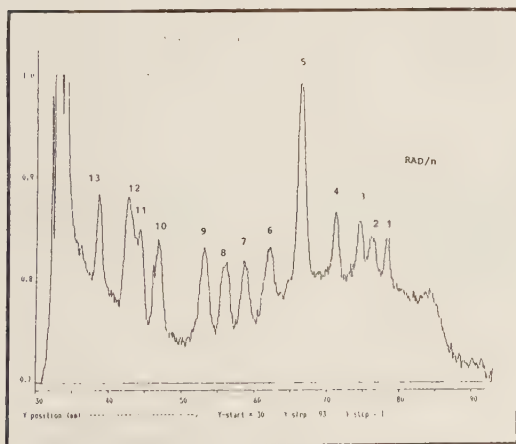
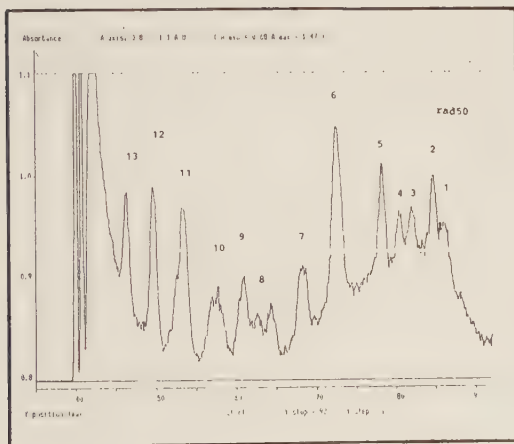
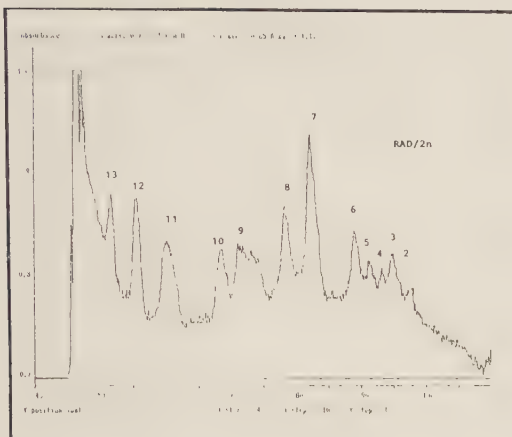
Chromo-
som

Bande

XII — 13
IV — 12
VII
XV — 11
XIII
XVI — 10

II — 9
XIV — 8
X — 7
XI — 6
V — 5
VIII
IX — 4
III — 3
VI — 2
I — 1





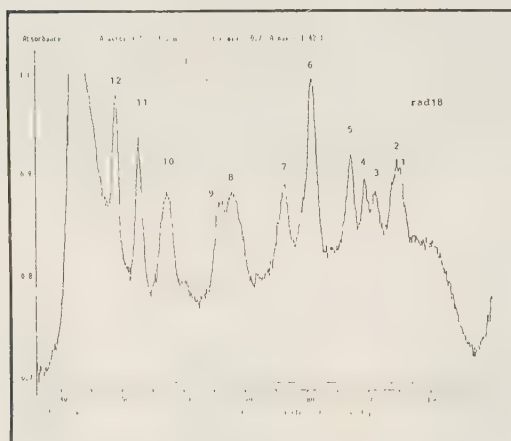
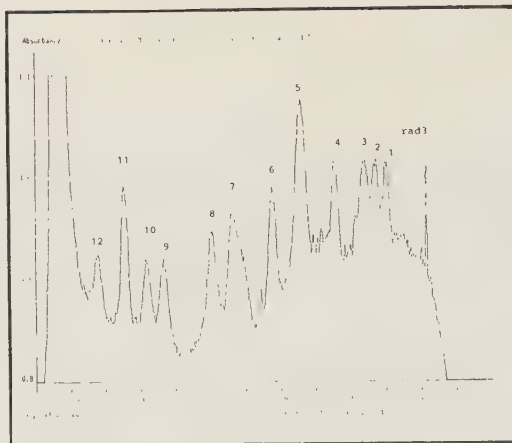


Abb. 39:
Densitogramme von Gelen, in denen die verschiedenen
Reparaturmutanten aufgetrennt worden waren, zur Ver-
deutlichung der in späteren Grafiken verwendeten Ban-
dennummerierung.

Die Auftrennung der nach 2.6. hergestellten Lysate in der OFAGE und die Auswertung der Densitogramme der entsprechenden Gelphotonegative führte zu den Grafiken von Abb. 40.

Die Experimente wurden bis zu drei Mal wiederholt. Jede Gelspur wurde an 3 verschiedenen Stellen mit dem Densitometer abgegriffen. Die relativen Flächenanteile einer jeden Bande wurden auf die in der Gelspur aufgetrennte Gesamt-DNS-Menge bezogen. Der Quotient F aus dem Mittel der Flächenanteile einer bestimmten Bande in den Gelen, in denen Lysate von nach Bestrahlung mit 200 Gy während distinkter Zeitintervalle in Puffer gehaltener Zellen aufgetrennt worden waren, und den gemittelten Flächenanteilen der entsprechenden Bande, abstammend von unbestrahlten Zellen, lieferte die Grundlage für die Berechnung der strahleninduzierten Brüche n nach

$$n = -\ln F.$$

Die Differenz aus den durch Bestrahlung und Sl-Nuclease-Behandlung induzierten Doppelstrangbrüchen (s. Tab. 4) und den nur durch Bestrahlung induzierten Brüchen lieferte die Anzahl der Sl-Nuclease-sensitiven Stellen, wie sie in Tab. 5 und Abb. 40 dargestellt sind.

In den Vergleich wurden nur die Banden 13 (bzw. 12) bis 6 (bzw. 5) einbezogen, da die schneller wandernden Banden vom Schmier im unteren Gelbereich überlagert wurden, der auf degradierte DNS zurückgeht. Dieser Schmier verfälscht den Flächenanteil der in diesen Banden wandernden ungebrochenen DNS kleinerer Chromosomen. Da eine Banden - Chromosomen-Zuordnung über Southern-Hybridisierung unterblieb, die Nummerierung der Banden mit der am schnellsten im Gel migrierenden als Nummer 1 begann, wurden nur Banden und damit Chromosomen der verschiedenen Stämme mit annähernd gleicher Migrationsgeschwindigkeit verglichen.

Tab. 4:

Doppelstrangbrüche pro in einer bestimmten Bande im Gel migrierendem DNS-Molekül, nach Bestrahlung der Zellen mit 200 Gy in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Zellen in Puffer (Liquid Holding Recovery, LHR)

LHR t (h) Bande

RAD/2n

	13	12	11	10	9	8	7	6
0	0.17	0.24	0.40	0.20	0.20	0.20	0.25	0.20
4	0.15	0.14	0.14	0.20	0.18	0.18	0.08	0.17
8	0.10	0.03	0.12	0.13	0.10	0.12	0.04	0.14
12	0.08	0.01	0.10	0.12	0.09	0.10	0.05	0.12
24	0.02	0.01	0.04	0.05	0.04	0.05	0.01	0.02
48	0.01	0.01	0.04	0.01	0.01	0.04	0	0

RAD/n

	13	12	11	10	9	8	7	6
0	0.15	0.14	0.15	0.08	0.06	0.06	0.08	0.10
2	0.15	0.10	0.08	0.06	0.06	0.06	0.06	0.09
4	0.14	0.10	0.12	0.05	0.08	0.07	0.11	0.09
12	0.10	0.13	0.10	0.06	0.05	0.05	0.08	0.08
24	0.10	0.12	0.10	0.05	0.05	0.04	0.09	0.09

rad3/2n

	12	11	10	9	8	7	6	5
0	0.26	0.36	0.16	0.18	0.19	0.29	0.05	0.11
2	0.09	0.20	0.10	0.13	0.13	0.24	0.05	0.10
4	0.08	0.21	0.08	0.10	0.14	0.16	0.031	0.04
8	0.02	0.15	0.08	0.07	0.11	0.06	0.03	0.03
24	0.01	0.12	0.05	0.07	0.09	0.06	0	0.02

rad18/2n

	12	11	10	9	8	7	6	5
0	0.35	0.20	0.20	0.17	0.10	0.16	0.10	0.07
2	0.31	0.18	0.19	0.17	0.10	0.12	0.08	0.07
4	0.26	0.13	0.19	0.16	0.09	0.10	0.08	0.06
8	0.20	0.09	0.13	0.10	0.06	0.09	0.05	0.04
12	0.12	0.06	0.09	0.08	0.05	0.05	0.04	0.04
24	0.05	0.03	0.06	0.04	0.02	0.01	0.03	0.02

rad50/2n

	13	12	11	10	9	8	7	6
0	0.11	0.10	0.11	0.09	0.17	0.09	0.15	0.08
2	0.08	0.11	0.09	0.09	0.14	0.08	0.11	0.08
4	0.08	0.06	0.10	0.06	0.16	0.05	0.11	0.10
8	0.06	0.06	0.08	0.05	0.14	0.06	0.12	0.08
12	0.05	0.06	0.08	0.04	0.10	0.05	0.10	0.07

Tab. 5:

Sl sites, d.h. Brüche pro in einer bestimmten Bande im Gel migrierendem DNS-Molekül, die nach Bestrahlung der Zellen in der isolierten DNS durch die Aktivität der Sl-Nuclease im Sl-Verdau auftraten, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Zellen in Puffer (Liquid Holding Recovery, LHR)

LHR t (h) Bande

RAD/2n

	13	12	11	10	9	8	7	6
0	0.32	0.42	0.59	0.43	0.39	0.34	0.56	0.40
4	0.21	0.24	0.20	0.32	0.35	0.30	0.12	0.30
8	0.17	0.03	0.20	0.27	0.17	0.27	0.08	0.22
12	0.15	0.03	0.13	0.27	0.15	0.15	0.08	0.20
24	0.03	0.03	0.08	0.09	0.08	0.11	0.01	0.02
48	0.02	0.02	0.07	0.01	0.01	0.08	0.01	0.01

RAD/n

	13	12	11	10	9	8	7	6
0	0.25	0.20	0.26	0.10	0.11	0.12	0.13	0.17
2	0.29	0.19	0.19	0.09	0.12	0.14	0.10	0.13
4	0.27	0.15	0.24	0.10	0.14	0.12	0.19	0.16
12	0.24	0.21	0.18	0.12	0.09	0.10	0.13	0.15
24	0.22	0.19	0.16	0.09	0.07	0.08	0.16	0.13

rad3/2n

	12	11	10	9	8	7	6	5
0	0.65	0.89	0.46	0.31	0.44	0.72	0.12	0.27
2	0.22	0.57	0.27	0.24	0.32	0.59	0.11	0.20
4	0.20	0.53	0.18	0.12	0.28	0.39	0.08	0.09
8	0.04	0.36	0.17	0.12	0.27	0.16	0.07	0.06
24	0.02	0.30	0.07	0.04	0.19	0.12	0.01	0.05

rad18/2n

	12	11	10	9	8	7	6	5
0	0.66	0.46	0.41	0.38	0.22	0.36	0.25	0.18
2	0.58	0.40	0.39	0.41	0.18	0.36	0.23	0.14
4	0.57	0.43	0.41	0.37	0.19	0.28	0.25	0.15
8	0.60	0.38	0.38	0.36	0.17	0.35	0.22	0.16
12	0.58	0.41	0.40	0.40	0.13	0.29	0.22	0.14
24	0.56	0.35	0.40	0.38	0.20	0.30	0.25	0.12

rad50/2n

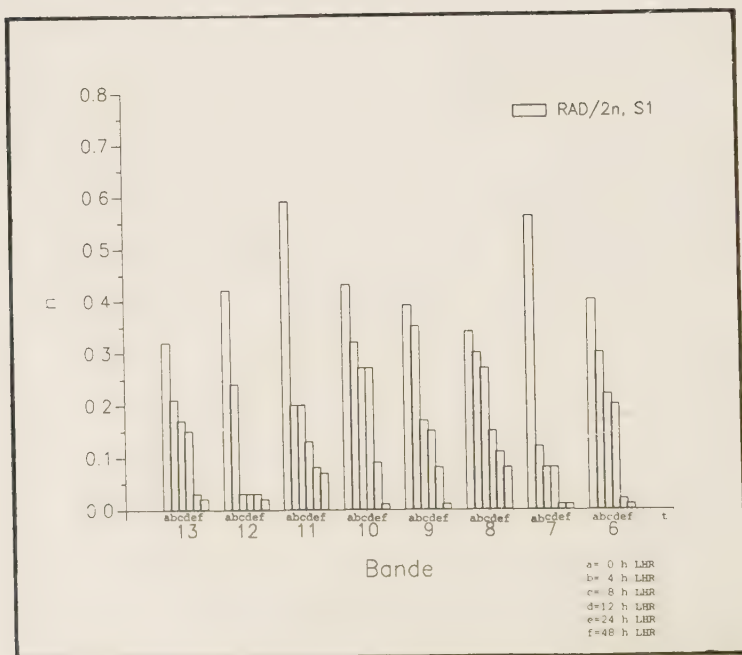
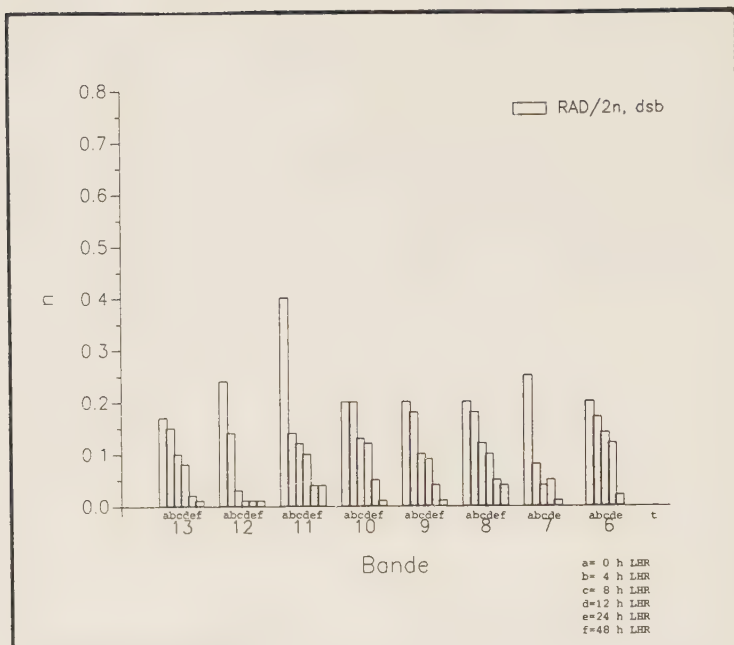
	13	12	11	10	9	8	7	6
0	0.20	0.16	0.17	0.12	0.27	0.14	0.24	0.13
2	0.15	0.17	0.14	0.15	0.28	0.13	0.18	0.12
4	0.21	0.09	0.12	0.11	0.25	0.09	0.25	0.16
8	0.13	0.17	0.17	0.12	0.27	0.12	0.24	0.13
12	0.22	0.14	0.21	0.09	0.25	0.16	0.20	0.10

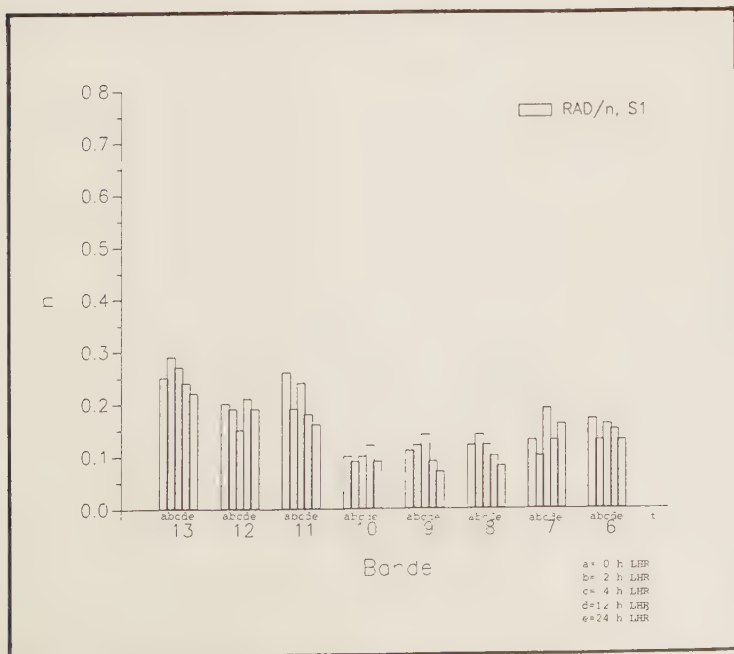
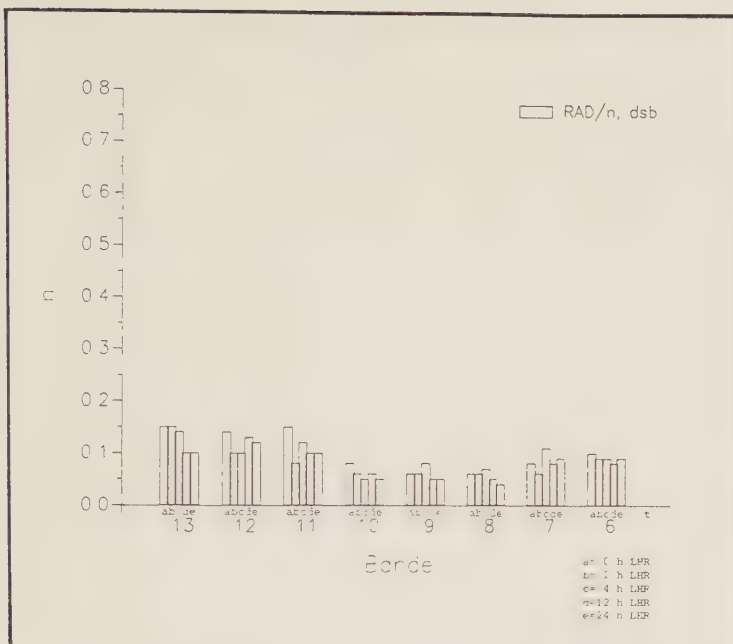
Die in Tab. 4 und 5 aufgelisteten Daten, die in Abb. 40 als Balken grafisch dargestellt wurden, sind gemittelte Werte aus einer Fülle von Einzeldaten (erhoben aus 1 bis 3 Parallelbestrahlungen, 1 bis 3 Gelen pro Dosis und Stamm und 3 Densitometrien pro Gel), die der Übersichtlichkeit halber nicht gesondert aufgeführt werden. Die Erhebung derart vieler Einzeldaten war nötig gewesen, um signifikante Mittelwerte berechnen zu können und der teilweise erheblichen Abweichung vom statistischen Mittel (von bis zu maximal $\pm 40\%$) Rechnung zu tragen. Die große Schwankungsbreite der Werte läßt sich zum einen erklären durch die vielen experimentellen und auswertungstechnischen Schritte, die für die Quantifizierung von Massenverlusten und -gewinnen nötig sind, angefangen von der Lysatherstellung, der Auftrennung im Gel, bis hin zur Fotografie und Densitometrie. Die Bestrahlungsdosis von 200 Gy war so niedrig gewählt, daß in keinem Fall 1 Bruch/Molekül erfolgte, meist bewegte sich die Bruchinduktionsrate im Dezimalbereich. Bei derart kleinen Zahlen wirken sich Abweichungen naturgemäß stärker aus. Dennoch ist die Möglichkeit, solch kleine Bestrahlungsdosen zu applizieren, die die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen und damit das Überleben nur auf ca. 40-50 % reduzieren, und dennoch Effekte sichtbar machen zu können, der unschätzbare Vorteil der angewandten Methode, auch wenn größere Schwankungen der Einzelwerte in Kauf genommen werden müssen. Die hohe Auflösung dieser Technik erfordert die Wahl einer Bestrahlungsdosis, bei der zum einen schon ein Effekt meßbar ist, die zum anderen jedoch noch nicht so groß ist, daß die Banden im Gel zugunsten des Degradierungsschmiere niedermolekularer DNS-Fragmente verschwunden sind.

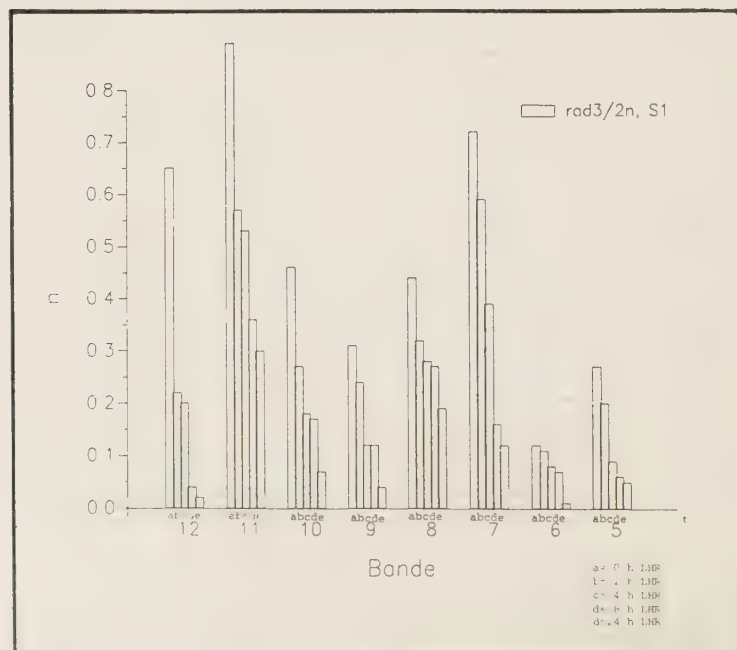
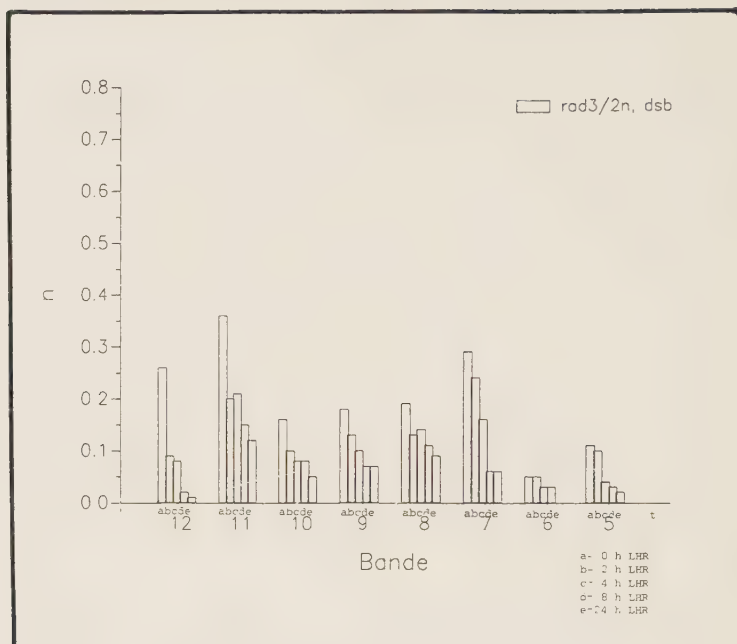
Abb. 40:

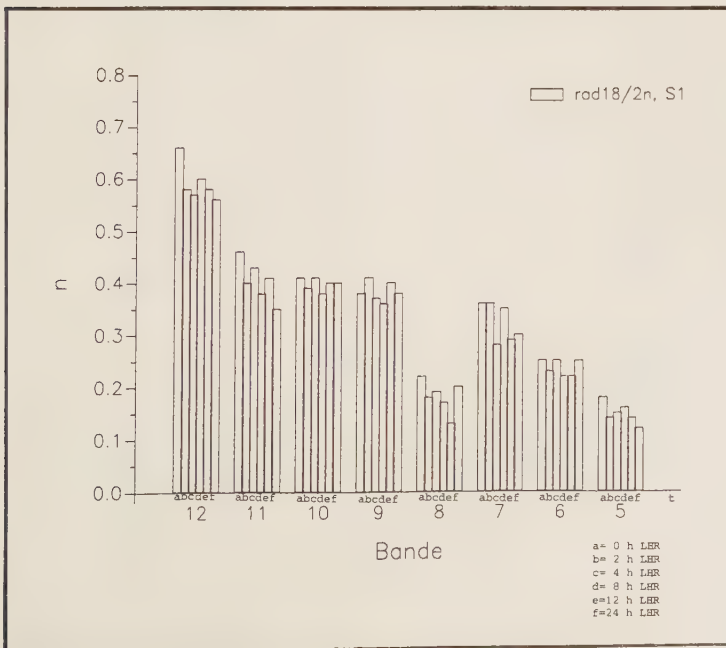
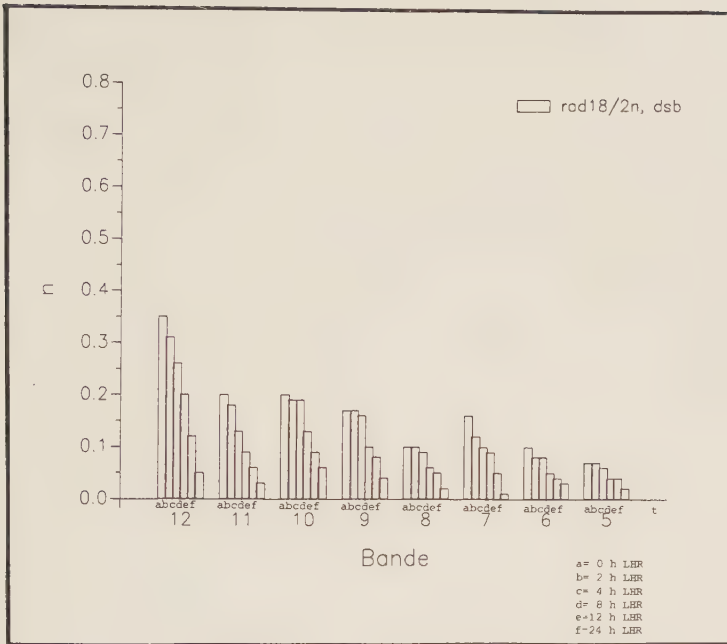
Gamma-induzierte Doppelstrangbrüche (A,B,C,D,E) und Molekülbrüche, die auf die Aktivität der S1 Nuclease zurückgehen (a,b,c,d,e), in der DNS der verschiedenen Chromosomen (sichtbar als Banden in den OFA-Gelen) nach Bestrahlung der Zellen verschiedener Reparaturmutanten von *Saccharomyces cerevisiae* mit 200 Gy, Inkubation der Zellen bei 30°C in Phosphatpuffer und S1-Behandlung der aus ihnen hergestellten Lysate

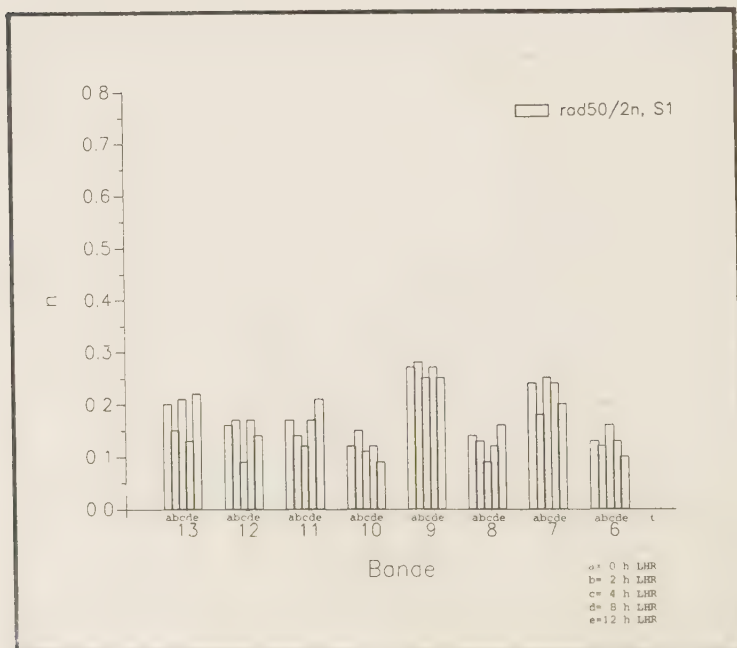
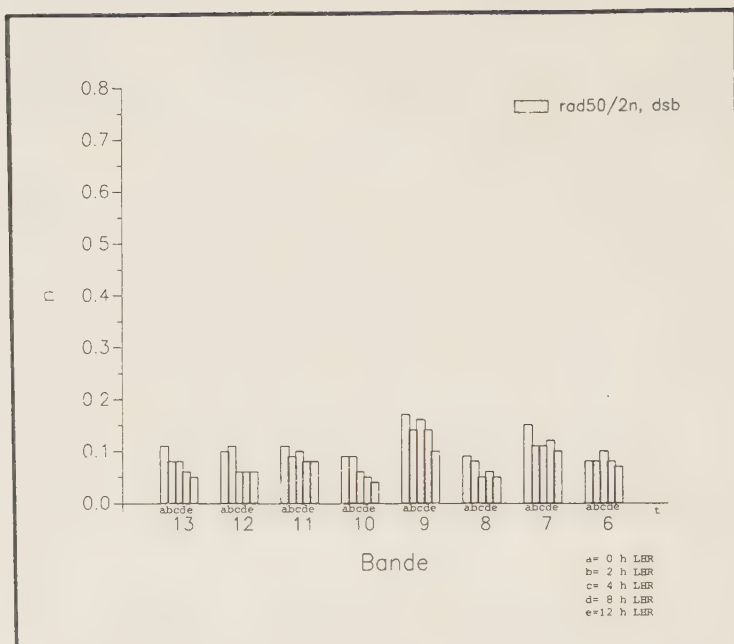
- (a) reparaturprofizienter diploider Wildtyp-Stamm BK0 (RAD/2n)
 - (b) reparaturprofizienter haploider Wildtyp-Stamm RS3 (RAD/n)
 - (c) diploide rad3-Mutante BK3 (rad3/2n)
 - (d) diploide rad18-Mutante BK18 (rad18/2n)
 - (e) diploide rad50-Mutante BK50 (rad50/2n)
- Abszisse: Banden (Nummerierung wie in Abb.39 angegeben)
 Ordinate: S1 = S1-Nuclease-sensitive Stellen
 dsb = Doppelstrangbrüche











Jeder einzelne Balken der in Abb. 40 dargestellten Balkendiagramme symbolisiert den Mittelwert aus drei Molekülbruch-Daten einer bestimmten Gelbande für eine bestimmte Reparaturzeit. Nimmt die Höhe der Balken mit der Inkubationszeit ab, so wird dies als Reparaturreffekt gewertet. Schwankt die Höhe der Balken mit der Inkubationszeit um einen gleichbleibenden Wert, so fand offensichtlich keine Reparatur nach Schadenssetzung statt. Für jede Mutante werden in Abb. 40 die Änderungen der Zahl von Doppelstrangbrüchen und SI-Nuclease-sensitiven Stellen in den einzelnen den Chromosomen entsprechenden Banden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit verglichen. Demnach nimmt die Anzahl der Doppelstrangbrüche mit der Reparaturzeit bei allen Stämmen ab, bei den rad50-Mutanten in geringem Ausmaß, nicht jedoch bei der haploiden Mutante. Die Zahl der SI-sites nahm nur im Falle des diploiden reparaturprofizienten Wildtypstammes und der in der Exzisionsreparatur defizienten Mutante ab. Unverändert blieb die Anzahl der sich nach SI-Verdau als Doppelstrangbrüche manifestierenden SI-Nuclease-sensitiven Stellen auch nach langem Liquid Holding Recovery im reparaturprofizienten Haplonten, in der diploiden Mutante rad18, die geringe Röntgenstrahlenempfindlichkeit zeigt, und in der diploiden Mutante rad50, die in der Strangbruchreparatur gestört ist.

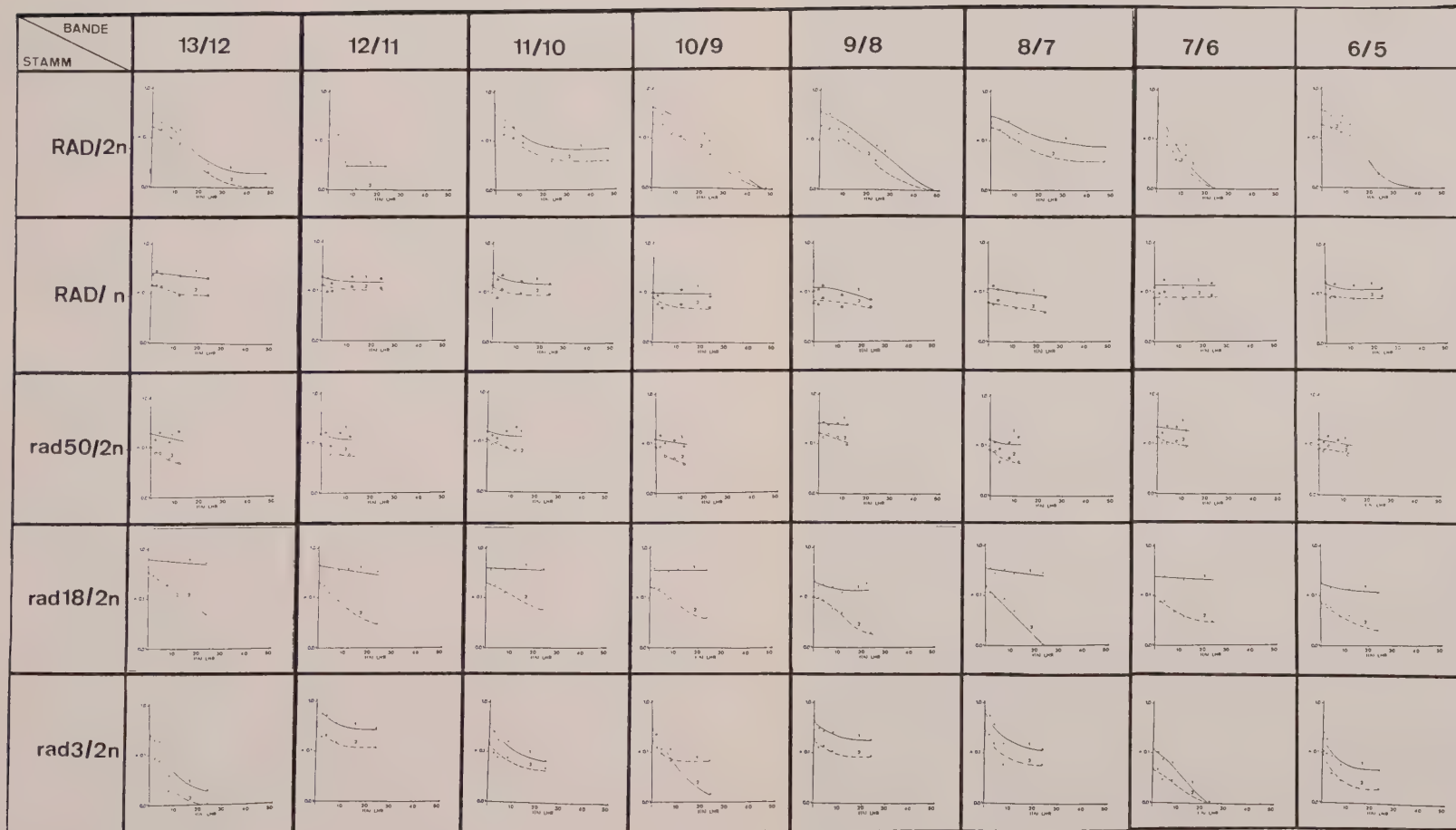
Abb. 41 soll die Reparaturkinetiken von Doppelstrangbrüchen und SI-Nuclease-sensitiven Stellen in den einzelnen Chromosomen der verschiedenen Stämme, die im OFA-Gel als Banden untersucht wurden, und die sich teilweise stark unterschieden, in der Übersicht darstellen.

Abb. 41:

Anzahl der Doppelstrangbrüche und SI-Nuclease-sensitiven Stellen pro Molekül in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Zellen nach Bestrahlung mit 200 Gy unter Nichtwachstumsbedingungen, aufgetragen für die einzelnen Banden der verschiedenen in den Gelen aufgetrennten Stämme. Die Bezeichnungen sind der Abbildung 40 zu entnehmen.

(1)= SI-Nuclease-sensitive Stellen

(2)= Doppelstrangbrüche



3. DISKUSSION

Die Analyse der Reparatur von gamma-induzierten Doppelstrangbrüchen in den einzelnen Chromosomen verschiedener Hefe-Mutanten ließ zunächst klar erkennen, daß zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen in stationären Zellen das Genom in zweifacher Kopienzahl vorliegen muß, um Rekombinationsvorgänge zu ermöglichen.

Der reparaturprofiziente haploide Wildtyp war zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen offensichtlich nicht fähig. Eine Abnahme der Doppelstrangbrüche, die als Reparaturreffekt gewertet wird, war jedoch beim diploiden reparaturprofizienten Wildtyp erkennbar, ebenso wie in den Stämmen, die Mutationen in den Genen RAD3 und RAD18 aufweisen. Dies entspricht der Erwartung auf Grund genetischer und biochemischer Analysen (Higgins et al. 1983; Game 1983; Mowat et al. 1983; Haynes und Kunz 1981). Mutationen in den Genen RAD3 und RAD18 schienen keine Auswirkung auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu haben.

Unklar ist die Rolle des Genprodukts von RAD50 bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Genetische Analysen ordnen rad50-Mutanten zwar der im Doppelstrangbruch-Reparaturweg gestörten Epistasisgruppe zu (Game 1983), doch wurde eine gewisse Fähigkeit zur Doppelstrangbruch-Reparatur gefunden (Budd und Mortimer, unveröffentlicht). Biochemische Untersuchungen stehen noch aus.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse sprechen der verwendeten rad50-Mutante eine nicht sehr deutlich ausgeprägte Fähigkeit zur Doppelstrangbruch-Reparatur zu.

Einschränkend muß erwähnt werden, daß bei den applizierten Gamma-Dosen derart wenige Doppelstrangbrüche auftreten (im Vergleich zu S1-Nuclease-sensitiven Stellen mindestens um den Faktor 1.5 weniger), daß weitergehende Aussagen zweifelhaft erscheinen. Untersuchungen nach Bestrahlung mit etwas höheren Dosen sind im Gange.

Klar ersichtlich wird bei Betrachtung der Grafiken, daß die Stämme, die eine Mutation in den Genen RAD50 und RAD18 tragen bzw. ein haploides Genom mit Wildtyp-Reparaturgenen besitzen, keine Tendenz zur Reparatur von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen nach Inkubation der bestrahlten Zellen in Puffer zeigten. Die Sl-Nuclease-induzierten Brüche nahmen aber mit zunehmender Inkubationszeit beim diploiden RAD-Wildtyp und beim rad3-Stamm ab und verschwanden nach 48 Stunden fast vollständig.

Danach sind also Genprodukte zur Reparatur von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen nötig, die in rad50- und rad18-Mutanten fehlen, über die aber reparaturprofiziente diploide Zellen und Zellen, die in der UV-Reparatur geschädigt sind, verfügen. Die Tatsache, daß der zwar reparaturprofiziente, jedoch haploide Stamm ebenso nicht zur Reparatur von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen unter Nichtwuchsbedingungen in Puffer fähig war, wie die in der Rekombinationsreparatur geschädigte rad50-Mutante, kann als Hinweis auf eine Beteiligung von Rekombinationsvorgängen an der Reparatur dieser gamma-induzierten Läsionen gewertet werden.

Sl-Nuclease-sensitive Stellen scheinen nicht homogen über das Gesamtgenom verteilt induziert zu werden. In der transkriptionsinaktiven Zentromerregion, wie auch in reprimierten Genen wurden auch nach Applikation hoher Bestrahlungsdosen keine Sl-sites nachgewiesen. Es fanden sich jedoch Hinweise für die Induktion dieser Basenschäden im transkriptionsaktiven PHO5-Gen.

ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Bei letalen Läsionen, d.h. Schäden in der DNS, die zum Zelltod führen, handelt es sich nicht um einzelne geschädigte Stellen, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit um ausgedehntere Schadensbereiche, sog. "Locally Multiple Damaged Sites" (LMDS), die sowohl Doppelstrangbrüche als auch Basenschäden umfassen (Ward 1986b). Obwohl Basen in der DNS ungefähr doppelt so häufig geschädigt werden wie Zucker (Ward 1986a), ist über ihre Reparaturbarkeit fast nichts bekannt. Besondere Bedeutung erlangte in letzter Zeit die Untersuchung von Reparaturmechanismen geschädigter Stellen an gegenüberliegenden DNS-Strängen in Zusammenhang mit der Frage nach der Hierarchie von Reparaturprozessen (Ward 1986a).

In diesem Kontext sind auch die im Zuge der vorliegenden Untersuchung im Genom der Hefe Saccharomyces cerevisiae, einem Modellorganismus für eukaryotische Gen- und Chromatinstruktur, ausgeführten Analysen an gamma-induzierten Basenschädigungen zu sehen, die zur lokalen Denaturierung der Duplex-DNS führen, zu partiell einzelsträngigen Bereichen also, die von der Sl-Nuclease erkannt und in Doppelstrangbrüche prozessiert werden.

Die Untersuchung der Reparatur solcher Läsionen, die koloniebildungsfähige Zellen und damit die Anwendung von für die Hefe sehr kleinen Gamma-Dosen voraussetzt, war erst möglich geworden durch die Auftrennung von ungebrochener Hefe-DNS in Chromosomengröße in der gepulsten Agarose-Gelelektrophorese (OFAGE). Die durch die in dieser Arbeit gewonnene Kenntnis über die Verteilung von Doppelstrangbrüchen und Sl-Nuclease-sensitiven Stellen nach Gamma-Bestrahlung von Zellen auf die einzelnen Chromosomen ist das Verdienst dieser äußerst empfindlichen Methodik zur Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen. Die Anwendung dieser neuen molekularbiologischen Methodik zusammen mit anderen modernen moleku-

larbiologischen Techniken auf strahlenbiologische Fragestellungen, wie sie zum Teil in dieser Arbeit vorgestellt wurde, macht die Untersuchung und Beantwortung vieler offener Probleme in der molekularen Strahlenbiologie möglich, die von grundlegender und allgemeiner Bedeutung für das Verständnis von DNS-Reparatur, Mutagenese, Kanzerogenese sind.

Nur eine genaue Kenntnis der Sl-Aktivität unter den gewählten Bedingungen erlaubte die Analyse komplexer Sl-Nuclease-sensitiver Basenschäden im Gesamtgenom, die sich erst nach Enzymbehandlung erfassen lassen. Durch die Ausarbeitung konstanter, definierter Reaktionsbedingungen konnte davon ausgegangen werden, daß in allen Versuchen nur spezifische Schäden dieser einen Art erfaßt wurden. Da die Aktivität der Nuclease Sl je nach Reaktionsbedingungen sehr unterschiedlich ist, wurde ihre Substratspezifität unter den gewählten Reaktionsbedingungen getestet. Nach den ersten vorläufigen Versuchen, die in Teil I beschrieben wurden, stellen schon bestimmte "single base mismatches" (A/A, A/G, C/T), also die Fehlpaarung einer Base, ein Substrat für die Nuclease Sl dar. Die Sl-Nuclease degradierte einzelsträngige DNS vollständig, griff doppelsträngige intakte DNS nicht an und inzidierte nicht gegenüber von DNase- oder gamma-induzierten Einzelstrangbrüchen. Ihre Aktivität in geschmolzener, auf den sauren pH 4.5 equilibrierter Agarose entsprach der in wäßriger Lösung desselben pH-Wertes und wurde von Proteinase K und dem Proteinase K-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid nicht beeinträchtigt. Auch das System der Orthogonalen Wechselfeldelektrophorese mußte auf die speziellen Anforderungen dieser Analyse in der durchgeführten und in Teil I beschriebenen Weise angepaßt und erweitert werden.

Mit der optimierten und an die Erfordernisse der gestellten Problematik adaptierten Technik der OFAGE gelang der Nachweis von geschädigten SI-sensitiven Bereichen in der Hefe-DNS nach Gamma-Bestrahlung der Zelle unter Bedingungen, die die direkte Strahlenwirkung fördern.

Demnach traten gamma-induzierte, die DNS denaturierende Basenschäden, die für die SI-Nuclease sensitiv sind, im Durchschnitt ebenso häufig im Hefegenom auf wie gamma-induzierte Doppelstrangbrüche, unabhängig vom genetischen Hintergrund der einzelnen Stämme. Im Gegensatz dazu wurden sie in Lambda-DNS doppelt so häufig induziert wie Doppelstrangbrüche (Martin-Bertram et al. 1983). Sie zeigten auch in Hefe eine lineare Dosisabhängigkeit, zumindest im Bereich bis 500 Gy, und zwar im Wildtyp ungefähr $6,5 \times 10^{-10}$ SI-sites (wie auch Doppelstrangbrüche) pro Gy und Nukleotid bei der Dosis D_0 . Dieser Wert stimmt mit den Literaturdaten für Doppelstrangbrüche von 3.7×10^{-7} dsb/GyxNukleotid (gemessen nach Bestrahlung in Luft) gut überein (Frankenberg-Schwager et al. 1979). Diese Linearität deutet auf ein "single energy loss event" hin, bei dem die Läsion nicht durch aufeinander folgende Bestrahlungsereignisse entsteht - dies hätte eine quadratische Dosisabhängigkeit des Schadensertrages zur Folge - sondern durch ein einzelnes ionisierendes Ereignis, wie es auch für Doppelstrangbrüche der Fall ist (Ward 1986b; Frankenberg-Schwager et al. 1980).

Aus Studien an DNS in trockenen, kristallinen Filmen, die die direkte Aktion der Strahlung maximieren, ist bekannt, daß neben den statistisch produzierten, primären Strangbrüchen die direkte Absorption der ionisierenden Energie zum Auftreten nicht zufällig verteilter, sekundärer Brüche führt (Baverstock 1985). Direkt absorbierte Ionisierungsenergie kann durch die DNS "wandern" und dabei Schäden an Stellen verursachen, die von der Stelle primärer Ionsierung (Adams 1967) oder vom ursprünglichen Schaden entfernt sind, z.B. dem Verlust

einer Wasserstoffbrückenbindung nach Basenschädigung oder Einzelstrangbrüchen (Baverstock 1985). Die Wahrscheinlichkeit für einen Doppelstrangbruch ist an einer vorgeschädigten Stelle höher (Chadwick und Leenhouts 1981).

Diese Befunde waren Anlaß für die Untersuchung, ob Sl-Nuclease-sensitive Stellen ebenso wie Doppelstrangbrüche statistisch über das Hefe-Genom verteilt auftreten, oder gehäuft in bestimmten Bereichen.

Tatsächlich wurden in transkriptionsinaktiven Regionen, sie den reprimierten Genen PHO5 und ADH2 keine Sl-Nuclease-sensitiven Stellen gefunden. Auch die in Bezug auf Transkription inerten Zentromerbereiche der Hefechromosomen IV und VI erwiesen sich als resistent gegenüber der Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen, wie dies auch von Säugerchromosomen bekannt ist (Oleinick et al. 1983). Als Hinweis dafür, daß die spezifische Struktur des Chromatins in bestimmten Genombereichen der DNS Einfluß hat auf die Ausbildung von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen, wird das Ergebnis gewertet, daß solche Schäden nach Induktion der sauren Phosphatase im transkribierten PHO5-Gen gefunden wurden.

Für Säuger-DNS wurde postuliert, daß die unterschiedliche Sensitivität aktiver und inaktiver DNS-Sequenzen auf der unterschiedlichen Zugänglichkeit der Chromatinstruktur beruht (Oleinick et al. 1983). So weiß man, daß neu replizierte DNS vergleichsweise empfindlicher gegenüber strahleninduzierten Thyminbasenschäden ist als nicht replizierende DNS (Warters und Childers 1982).

Die gefundenen Ergebnisse bezüglich der bevorzugten Induktion von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen in transkriptionsaktiven Regionen des Genoms, die jedoch nicht sequenzspezifisch erfolgte, befindet sich also im Einklang mit neuen Daten von ähnlichen Analysen des Säuger-Genoms. Die inhomogene Schadensverteilung, wie sie häufig in der DNS gefunden wird, könnte auch eine Folge von selektiven Reparaturvorgängen sein. Die DNS-Zugänglichkeit stellt

einen Faktor für Geschwindigkeit und Ausmaß der DNS-Reparatur dar, besonders bei Mechanismen, die auf Kontakt von Reparaturenzymen und Substraten mit geschädigter DNS beruhen. Nach Daten von Oleinick et al. (1983) werden sowohl Bildung als auch Reparatur von Strangbrüchen durch ionisierende Strahlung von der Chromatinstruktur beeinflusst. Die Beziehung zwischen Reparaturkinetiken und dem Überleben der Zellen ist möglicherweise darin zu suchen, daß in eng geknäuelten, weniger zugänglichen Chromatinregionen zwar weniger initiale Strahlenschäden induziert werden, diese jedoch im wesentlichen unreparierbar sind (Oleinick et al. 1983). Der große Einfluß der Chromatinstruktur auf Schadenssetzung, -ausmaß und -reparatur ist auch für andere Systeme beschrieben worden (Hanawalt 1986), wie den Proto-Onkogenen in Säuger-DNS c-abl und c-mos (Madhani et al. 1986) und dem Dihydrofolat-Reduktase Gen in Hamster-Zellen (Bohr et al. 1986). Die Tatsache, daß bestimmte essentielle Regionen bevorzugt repariert werden, spricht dafür, daß der Parameter "Qualität" der Reparatur für das Überleben der Zelle wichtiger zu sein scheint als der Parameter "Quantität" (Bohr et al. 1986).

Die Untersuchung von Reparaturprozessen der im Verlaufe dieser Arbeit im Hefe-Genom nachgewiesenen und etwas näher charakterisierten Sl-Nuclease-sensitiven Stellen erstreckte sich auf alle 3 in Hefe beschriebenen Reparaturwege, an Hand einzelner spezieller Reparaturmutanten als Repräsentanten für eine Vielzahl von verschiedenen Genen, die zu den 3 Epistasisgruppen gezählt werden.

Die Reparatur der Sl-sensitiven Läsionen im Hefe-Genom unter Nichtwuchsbedingungen bedarf offensichtlich der Genprodukte rad18-2 und rad50-1.

Stämme mit defektem RAD18-Gen, ebenso wie rad6-Mutanten, zeigen erhöhte Sensibilität gegenüber Röntgen- und UV-Strahlung. Zusätzlich sind beide empfindlich gegenüber

einer großen Zahl von Mutagenen. Sie sind in der strahleninduzierten Mutagenese defekt (Game et al. 1975). Doppelmутanten von rad6- und rad18-Allelen sind für sich nicht supersensitiv, aber beide liefern hypersensitive Mutanten, wenn sie mit rad Mutanten des Exzisions-Reparaturweges gekreuzt werden (Game und Cox 1973; Khan et al. 1970).

Diese Befunde sprachen schon früh dafür, daß beide Gene an einem Reparaturweg beteiligt sind und es sich dabei nicht um den Exzisions-Reparaturweg handelt (Game et al. 1975; Lemontt 1971; Moustacchi 1969; Resnick 1969; Lawrence 1974). Der RAD6-Locus spielt eine Rolle beim "error prone repair" in Hefe (Lawrence 1974). rad18-3-Mutanten verfügen über eine erniedrigte Fähigkeit Einzelstrang-"Nicks" oder "Gaps" zu reparieren (Boram und Roman 1976), und zeigen erhöhte spontane Genkonversion. Es wurde eine Doppelrolle von rad18 im Exzisions- als auch im mutagenen Reparaturweg vorgeschlagen (Boram und Roman 1976). Dabei könnte das RAD18-Genprodukt als Exonuclease eine gemeinsame Funktion im Dimer-spezifischen rad3-Exzisions-Reparaturweg und bei der Reparatur von Läsionen innehaben, die durch UV- und Röntgenstrahlen und Mutagenen induziert werden (Boram und Roman 1976).

RAD18-2 kodiert nach einer Arbeitshypothese von Mowat für ein Protein, das - soweit bekannt - an einem Schritt der DNS-Reparatur eingreift, der nach der Exzision bestimmter Basenschäden erfolgt, im Anschluß an die Aktion einer AP-Endonuclease, und der vielen Reparaturprozessen gemeinsam sein könnte (Mowat et al. 1983). Diploide homozygote rad18-Stämme zeigen erhöhte Raten spontaner, UV- und Gamma-induzierter mitotischer Rekombination und reparieren gamma-induzierte Einzel- und Doppelstrangbrüche (Mowat et al. 1983). Die Tatsache, daß die rad18-2-Mutante in den hier durchgeführten Reparaturversuchen während einer längeren, der Exposition mit ionisierender Strahlung folgenden Inkubation keine Doppel- und wohl auch keine Einzelstrangbrüche akkumulierte, wie

das von Mowat et al. 1983 beschrieben ist, liegt wohl daran, daß die Zellen in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen unter Nichtwuchsbedingungen in Puffer inkubiert worden waren, Bedingungen, die die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ermöglichen, und damit zu einem Ansteigen der Überlebensfraktion führen (Frankenberg-Schwager et al. 1980; Frankenberg und Frankenberg-Schwager 1981). Die Akkumulation von Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung unter Wuchsbedingungen ist wohl auf die dann stattfindende DNS-Synthese zurückzuführen. Die Tatsache, daß die starke Erhöhung der spontanen Rekombinationsrate hauptsächlich auf Genkonversion beruht (Boram und Roman 1976; Saeki et al. 1980), spricht für eine Rolle des RAD18-Genproduktes bei der Basenreparatur. Die Annahme, daß es sich bei den Sl-Nuclease-sensitiven Stellen tatsächlich um begrenzte ungepaarte DNS-Bereiche handelt, wird von dem Befund erhärtet, daß sie in rad18-Mutanten nicht repariert wurden.

Die Vermutung, daß die Reparatur von gamma-induzierten Basenfehlpaarungen Rekombinationsmechanismen erfordert, wurde bestätigt durch die Unfähigkeit der rad50-Mutante zur Reparatur dieser Schäden. Das RAD50-Genprodukt ist essentiell für die Bildung lebender Rekombinanten und scheint schon während der DNS-Synthese eine Rolle zu spielen (Game et al. 1980). rad50-Mutanten sind defekt in induzierter mitotischer Rekombination, meiotische Rekombination wurde nicht initiiert (Game et al. 1981; Resnick et al. 1986). Inhibierung der DNS-Synthese und Läsionen, die von DNS-schädigenden Agentien verursacht werden, bewirken Rekombination. Mutanten mit reduzierter Fähigkeit zum mitotischen Austausch erwiesen sich als UV- und Röntgenstrahlen-sensitiv (Rodarte-Ramon 1972; Rodarte-Ramon und Mortimer 1972).

Es scheint eine Beziehung zwischen Reparatur und induzierter Rekombination in Hefe zu bestehen (Kunz und Haynes 1981). Auf molekularer Ebene führt eine Akkumulation von Strangbrüchen zu Rekombinationsvorgängen (Game

et al. 1979). Es wurde jedoch noch nicht nachgewiesen, ob die Brüche selbst Rekombination getrennt von Reparaturvorgängen bewirken, oder ob die Brüche über einen Rekombinations-Reparaturprozess repariert werden. Es kann also zur Zeit nicht entschieden werden, ob Rekombination ein Reparaturprozeß ist oder ob nur einige Arten von Reparatur rekombinogen sind (Kunz und Haynes 1981). Es wurde vorgeschlagen, daß sowohl RAD18 als auch RAD52 an der induzierbaren postreplikativen Reparatur beteiligt sind, RAD52 auf direktem Weg, während RAD6 eine regulatorische Rolle spielen könnte (Prakash 1981). Die Reparatur von gamma-induzierten Doppelstrangbrüchen ist in der rad50-Mutante nicht völlig blockiert (Budd und Mortimer, pers. Mitteilung). Die hier ausgeführte Untersuchung der einzelnen Chromosomen zeigte, daß die Mutante weit unter der Reparatureffizienz des Wildtyps bezüglich Doppelstrangbruch-Reparatur lag.

Stationäre Zellen, die ein haploides Genom besitzen, können keine interchromosomale homologe Rekombination durchführen können. Da diese den Austausch von DNS-Stücken zwischen zwei Schwesterchromosomen voraussetzt, sind sie auch zur Doppelstrangbruchreparatur nicht befähigt.

Im Gegensatz zu *Escherichia coli* werden in Säugerzellen Doppelstrangbrüche offensichtlich auch ohne Hilfe homologer DNS-Moleküle repariert, wenn auch fehlerhaft. Wichtig scheint nur der Erhalt der intakten Chromatinfaser im kondensierten Metaphase-Chromosom zu sein, um Chromosomenaberrationen zu verhindern (Rydberg 1983). Die Restaurierung von Chromosomen mit Doppelstrangbrüchen via Rekombination nicht homologer DNS-Sequenzen ist in *Saccharomyces cerevisiae* noch nicht beschrieben worden.

Der untersuchte haploide, jedoch reparaturprofiziente Stamm zeigte zwar keinen hundertprozentigen, aber doch sehr starken Defekt in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (s. Abb. 41), reparierte jedoch keine S1-Nuclease-

sensitiven Stellen, was als weiteres Indiz gewertet wurde, daß die Reparatur von Sl-sites über Rekombinationsvorgänge abläuft.

Das RAD3-Gen in Hefe wird für die Einführung von Einzelstrang-Nicks in Pyrimidin-Dimere oder Interstrang-Cross-links enthaltende DNS benötigt, ist aber auch bedeutsam für andere zelluläre Prozessen, zusätzlich zur Inzision geschädigter DNS (Higgins et al. 1983). Eine Mutation im RAD3-Gen scheint eine Endonuclease zu inaktivieren, die auch eine Rolle in der Genkonversion spielen könnte (Reynolds und Friedberg 1980; Kunz 1981), da diploide rad3-Mutanten erhöhte UV-induzierte Genkonversion aufweisen. Spontane Genkonversion findet in rad3 Zellen normal statt.

Der Prozeß der Exzisionsreparatur entfernt zwar akkurat Läsionen in einem DNS-Strang, solange der Schwesterstrang als korrekte Matrize erhalten ist. Im Falle von LMDS versagt dieser Reparaturmechanismus jedoch, wenn es sich um 2 gegenüberliegende Schadensstellen handelt, seien es veränderte Basen oder Strangbrüche mit Nukleotidverlust. Dieser LMDS-Typ stellt einen für dieses Reparatursystem irreparablen Schaden dar (Ward 1986b).

Da die rad3-Mutante bezüglich der Reparatur von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen Wildtypverhalten zeigte, wird das RAD3 Genprodukt für die Reparatur dieser Schäden offensichtlich nicht benötigt. Zwar sind auch im Zuge von Rekombinationsreparatur inzidierende Enzyme erforderlich, diese müssen aber nicht mit dem RAD3 Genprodukt identisch sein, da die Zelle noch über eine Vielzahl derartiger Proteine verfügt, die sich jeweils unter anderem in der Schadenserkenkung unterscheiden.

Wie aus Untersuchungen mit Carcinogenen bekannt ist, hängt die Schadenssetzung an der DNS, die nicht zufällig erfolgt, nicht nur von der Basenzusammensetzung der

DNS-Sequenz und der Chromatinstruktur ab, sondern auch von der DNS-Konformation (Wogan und McMahon 1986; Oleinick et al. 1983).

Daher wurde die Induktion von S1-Nuclease-sensitiven Stellen auch in Plasmiden untersucht, die in der Zelle als Supercoils vorliegen. Neben den endogenen 2 μ -Plasmiden, die in hoher Kopienzahl in der Zelle vorliegen, konnten auch in Plasmiden, die die gleichen Gene trugen, die auch in Chromosomen des Kerns untersucht wurden, nämlich die Gene ADH2, ADH4 und Zentromer 4, keine derartigen Läsionen nachgewiesen werden. Der Nachweis von Doppelstrangbrüchen jedoch konnte in allen untersuchten Fällen geführt werden.

Vorstellbar wäre, daß das primäre ionisierende Ereignis auf Grund der Spannung, die im Supercoil-Molekül herrscht, eng auf den Initial-Bereich lokalisiert bleibt, eine Weitergabe der Energie an benachbarte Nukleotide nicht möglich ist und somit kein größerer ungepaarter DNS-Bereich entstehen kann, den die S1-Nuclease als einzelsträngig erkennt.

Weitergehende Überlegungen bezüglich bevorzugter Schadenssetzung S1-Nuclease-sensitiver Stellen an Übergängen von Z- zu B-DNS, methylierten Sequenzen oder A/T-reichen Regionen bleiben am momentanen Stand der Untersuchungen spekulativ und sollen daher nicht diskutiert werden, bevor weitere experimentelle Daten vorliegen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Struktur, Verteilung und Reparatur von Basenschäden in der DNS nach Bestrahlung von Hefezellen mit ^{60}Co -Gamma-Strahlen untersucht.

Danach scheint es sich um kleine DNS-Bereiche fehl- oder ungepaarter Basen relativ hoher Stabilität zu handeln, die mit ungefähr derselben Häufigkeit wie Doppelstrangbrüche im Genom induziert werden und wie diese eine lineare Dosisabhängigkeit zeigen. Im Unterschied zu Doppelstrangbrüchen scheinen sie jedoch nicht statistisch über das gesamte Genom verteilt aufzutreten: So konnten sie in Plasmiden, die in der Zelle in Supercoil-Konformation vorliegen, nicht nachgewiesen werden. Auch in transkriptionsinaktiven Genen des Kerngenoms, wie Zentromeren und den Genen ADH2, ADH4 und PHO5, deren Expression in der Zelle unter den angewandten Versuchsbedingungen reprimiert war, wurden keine Hinweise auf die Existenz von Sl-Nuclease-sensitiven Stellen gefunden, wohl aber nach Induktion der sauren Phosphatase mittels geeigneter Nährmedienzusammensetzung im transkribierten PHO5-Gen.

Sl-Nuclease-sensitive Stellen werden in *Saccharomyces cerevisiae* repariert, wie durch Liquid Holding nachgewiesen wurde, wobei Rekombinationsmechanismen ebenso eine Rolle spielen wie der Postreplikations-Reparaturweg, da die Genprodukte der Gene RAD50 und RAD18 involviert sind.

Teil IV: MATERIAL UND METHODEN

1. Stämme

1.1 Hefe-Stämme

a) BKO/RAD/2n

a	RAD	ade2-40	cyh2	trp5-12	ilv1-92
α	RAD	ade2-119	CYH2	trp5-27	ilv1-92

b) BK3/rad3

a	rad3	ade2-40	cyh2	trp5-12	ilv1-92
α	rad3	ade2-119	CYH2	trp5-27	ilv1-92

c) BK18/rad18

a	rad18-2	ade2-40	cyh2	trp5-12	ilv1-92
α	rad18-2	ade2-119	CYH2	trp5-27	ilv1-92

d) BK50/rad50

a	rad50-1	ade2-40	cyh2	trp5-12	ilv1-92
α	rad50-1	ade2-119	CYH2	trp5-12	ilv1-92

stammten aus dem Labor von B. Kunz und R. Haynes und sind durch Kreuzungen von D7-Abkömmlingen entstanden (Kunz 1981; Zimmermann 1975).

e) WV36-10a

a ade2 ura3-52 trp1 ADH2 adh1 Δ adh3 Δ
enthält das Plasmid YCp50-10a (ADH2-BamH I-Fragment im Plasmid YCp50)

f) WV36-201

a ade2 ura3-52 trp1 adh1 Δ adh2 Δ adh3 Δ

sind Konstruktionen von W. Vogel.

g) G4

a ade2-119 ura3-52 ade4 adh1 Δ ADH2 adh3 Δ
(ein MC31-Abkömmling)

h) G2

a ade2-119 ura3-52 ade4 adh1 Δ ADH2 adh3 Δ
(ein MC31-Derivat mit einem Ty in der Promoterregion des ADH4)

i) RS3/RAD/n

a trp1 ura3-52 ade4 SUC1 mal0

wurden von Dr. C. Morawetz zur Verfügung gestellt.

j) JH1030

ein diploider, reparaturprofizienter Stamm mit einem circulären Chromosom III wurde von Dr. J. Haber zur Verfügung gestellt.

1.2

E. coli-Stämme

Der verwendete Stamm E. coli HB 101 mit dem Genotyp

F⁻, hsd 20 (f β , m β), recA 13, ara-14, proA

2, lacY 1, galK 2, rpsL 20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, SupE

44, λ^- wurde freundlicherweise von W. Vogel zur Verfügung gestellt.

Der Recipientenstamm für M13-Einzelstrang-Phagen

JM 103 (Genotyp Δ (lacpro), thi, strA, supE, endA,

shcB, hsdR⁻, F' traD36, proAB, lacI^q, Z M15;

Messing et al. 1981) wurde vom Labor Peter Philippsen,

Basel, erhalten.

Zusätzlich wurde der Stamm BMH71-18 mit dem Genotyp

(lac-proAB), supE, thi; F' lacI^q, lacZ M15, proA⁺B⁺,

eine Konstruktion von Dr. B. Kramer, als Rezipient für M13-Phagen verwendet.

- 1.3. Bakteriophagen M13
Die Phagen M13mp2, M13mp2ser11, M13mp2oc11, M13mp2op11 und M13cg Δ 4 wurden mittels Oligonukleotid-dirigierter Mutationskonstruktion von B. Kramer erzeugt (Kramer et al. 1984). Ausgetauscht wurde jeweils die 2. Base im Codon 11 des lacZ-Inserts in der M13-DNS.
Codon 11 M13mp2: TTA (Codon für Leucin)
Codon 11 M13mp2ser11: TCA (Codon für Serin)
Codon 11 M13mp2oc11: TAA (Ochre-Stopp-Codon)
Codon 11 M13mp2op11: TGA (Opal-Stopp-Codon)
- 2.2. Plasmide
- 2.1. Zur Konstruktion des Plasmids pDP11, das mir D. Pridmore überließ, wurde das 2,9kb-HindIII-EcoRI-Fragment des Hefe-Zentromers VII in den Vektor pUC 8 integriert.
- 2.2. Das Hefe-Gen SUP17,14g von Chromosom IX, Insert im Plasmid pPM410 (Broach J.R., Friedman L., Sherman F., J. Mol. Biol. 150, 375-387, 1981; Beckman J.S., Johnson P.F., Abelson J., Science 196, 205-208, 1981) wurde von Dr. M. Olson erhalten und diente der Identifizierung von Chromosom IX.
- 2.3. Beim Klon 4 handelt es sich um ein 0,76kb großes EcoR I-Cla I-Fragment der dem PHO5-Gen von Hefe in 5'-3'-Richtung vorgeschalteten Sequenz, das in pBR322 kloniert wurde. Ich danke Prof. W. Hörz für das Überlassen dieses Plasmids.
- 2.4. Das ADH2-Gen von Hefe wurde für das Plasmid Bsa, das mir freundlicherweise von Dr. C. Morawetz zur Verfügung gestellt wurde, als BamHI-Fragment in die Tetrazyklinresistenzregion des pBR322 inseriert.
- 2.2.5. pYA4-2
Bei der Konstruktion dieses von Dr. V. Williamson stammenden Plasmids wurde die kodierende Region und die Promotorregion des ADH4 Gens in einen pUC8-Vektor kloniert (Williamson et al. 1981).
- 2.5. YCp50
Das Zentromerplasmid YCp50 mit seinen Hefeselektionsmarkern URA3, der CEN4- und der ARS1-Sequenz aus Hefe, die in pBR322 eingeführt wurden, liegt, wie seine nachstehend aufgeführten Derivate, mit 1 Kopie in der Hefezelle vor, kann jedoch in E. coli amplifiziert werden (Kuo und Campbell 1983).
- 2.6. YCp50-3a-22
Dieses Plasmid, das von W. Vogel konstruiert wurde, ist ein YCp50-Abkömmling, in dessen BamH I-Schnittstelle die ADH2-Region und in seine EcoR I-Region die ADH4-Region von Hefe kloniert wurden.
- 2.7. pLA433
Dieses Plasmid, das von Dr. P. Philippsen zur Verfügung gestellt wurde, ist eine Konstruktion aus einem Multicopy-Plasmid, dem YRp7, d.h. einer pBR322-Sequenz mit der Hefe-ARS/TRP1-Sequenz und der 2,67 kb großen Region, die das Centromer des Hefe-Chromosoms VI umfaßt (Panzeri und Philippsen 1982).

- 2.8. Bei der Konstruktion von pBR_S-ADH4 wurde das EcoR IBgl I-Fragment von pYA4-2 in einen pBR322-Vektor kloniert unter Erhalt einer zusätzlichen EcoR I-Schnittstelle in der Multi cloning site (W. Vogel).
- 2.9. YeCEN3-13 Chr III
Dieses Plasmid, ein pBR322-Derivat, das freundlicherweise von Dr. P. Philippsen zur Verfügung gestellt wurde, enthält eine URA3-Insertion in der CEN3-Region (McGrew et al. 1986).
- 2.10. YEp 2
Es wurde das Plasmid YEp 2 verwendet, ein pBR 322-Vektor mit einer in die Pst I site einklonierten 2um circle DNS-Sequenz aus *S. cerevisiae*. Die Tetrazyklinresistenz des pBR 322 ist erhalten und dient als Selektionssystem.
- 2.11. λ gtSC
Es handelt sich um einen λ -Vektor, in dessen Hind III site an Position 2680 ein SC 310 Insert kloniert wurde und der freundlicherweise von Dr. P. Philippsen zur Verfügung gestellt wurde.

3. Anzuchtbedingungen von Hefen

- 3.1. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen in YPD-Vollmedium (1% Yeast extract, 2% Bacto-Pepton, 2% D-Glucose) gezüchtet.
- 3.2. Sollte das Wachstum unter Glucoseausschluß erfolgen, so wurden 3% Glycerin und 3% Ethanol als einzige C-Quellen dem YP-Medium zugesetzt
- 3.3. Zellen, deren saure Phosphatase induziert werden sollte, wurden in Nieder-Phosphatmedium angezogen, das pro 500 ml 1 g L-Asparagin, 250 mg MgSO₄, 50 mg NaCl, 50 mg CaCl₂, 10 ml 1 M Natriumcitratpuffer pH 5, 500 μ l Spurenelement-Stammlösung (in 100 ml 50 mg Borsäure, 4 mg CuSO₄·5H₂O, 10 mg KJ, 20 mg Fe(III)Cl₃·6H₂O, 40 mg MgSO₄·7H₂O, 20 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 40 mg ZnSO₄·7H₂O), 20 ml 50% Glucose, 2 ml Riboflavin-Lösung (8 mg Riboflavin B₂, 8 mg 4p-Aminobenzoesäure, 80 mg Inositol auf 160 ml), 50 μ l Biotin-Lösung (auf 100 ml 2 mg D-Biotin, 2 mg Folsäure, 400 mg Pantothenat, 400 mg Niacin, 400 mg Pyridoxinhydrochlorid, 400 mg Thiaminhydrochlorid) und die entsprechenden Aminosäuren (20 mg/l Adenin, 20 mg/l Tryptophan, 30 mg/l Isoleucin, 150 mg/l Valin) enthielt.

4. Bestrahlungsbedingungen

Die Bestrahlungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie von J. Andrews angegeben (Andrews et al. 1984).

Eine einzelne Kolonie wurde in 250 ml YPD-Medium (1% Yeast extract, 2% Bacto-Pepton, 2% D-Glucose) überimpft und 24 Stunden bei 28°C im Schüttelwasserbad inkubiert bis die Kultur die stationäre Phase erreicht hatte. Die Zellen wurden nach der Ernte, die bei 6000 Upm in einer Hettich Tischzentrifuge erfolgte, zweimal in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) gewaschen und im selben Puffer bis zu einer Zelldichte von 2×10^9 Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden in das Be-

strahlungsgefäß überführt, in Eis gekühlt und für 30 Minuten mit Stickstoff durchperlt. Die Bestrahlung erfolgte dann unter Stickstoff bei 0°C in einer ^{60}Co -Gamma-Quelle (Typ Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Ltd) bei einer Dosisrate von ungefähr 63 Gy/min. Die maximal applizierte Dosis betrug 10 kGy.

5. Überlebenskurve

Ein Aliquot der unter Stickstoffatmosphäre bestrahlten Zellsuspension wurde auf YPD-Platten ausgestrichen. Die resultierenden Überlebenskurven für sämtliche Stämme finden sich in Teil III, 2.4.1.. Die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung mit 10 kGy, wie sie in Teil II ausgeführt worden war, war unter 2×10^8 Zellen gleich Null, d.h. es befanden sich unter 2×10^8 Zellen weniger als $0,5 \times 10^{-8}$ Überlebende.

6. Präparation von Hefe-DNS

6.1. Schnellpräparation von gesamtgenomischer Hefe-DNS nach Davis et al. (Davis et al. 1980)

10 ml stationäre (bzw. logarithmische) Übernachtskultur in Vollmedium wurden nach der Ernte gewaschen und wie unter 3. beschrieben bestrahlt. Die bestrahlten Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in 0,5 ml 0,9 M Sorbit, 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5, 14 mM β -Mercaptoethanol und 150 U Zymolyase/ml inkubiert, mit 50 μl 10 % SDS und anschließend mit 100 μl einer Proteinase K-Lösung der Konzentration 20 mg/ml versetzt und weitere 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde phenolisiert und die Nucleinsäuren mit 500 μl Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 500 μl Tris/EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) gelöst und mit 5 μl RNase-Lösung (10 mg/ml) für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Abkühlung auf Raumtemperatur, erneutes Phenolisieren, Präzipitieren und Waschen der DNS mit Ethanol schlossen sich an. Die gefällte DNS wurde durch Zentrifugation gesammelt, getrocknet und in 50 μl Tris/EDTA-Puffer aufgenommen.

6.2. Herstellung von Agaroselysaten

Die Zellen wurden nach der Bestrahlung zweimal mit 50 mM EDTA pH 7,5 gewaschen und mit 50 mM EDTA pH 7,5 auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^9$ gebracht. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Nach Pelletierung wurden die Zellen in 1,5 ml 50 mM EDTA pro 1×10^{10} Zellen aufgenommen. Zu dieser Zellsuspension wurden 0,5 ml SEC-Puffer (1 M Sorbit, 0,1 M EDTA, 0,01 M Citrat-phosphatpuffer pH 7,0), 25 μl β -Mercaptoethanol und 10 mg Zymolyase 20000 (aus *Arthrobacter luteus*, Miles) zugegeben. Die Zellsuspension wurde mit 2 ml 1% low-melting Agarose (BRL) in 0,125 M EDTA pH 7,5 bei 42°C vermischt, in 150 μl Portionen in eine sterile Teflon-Lochplatte pipettiert und bis zum Erstarren auf Eis gestellt. Die Agaroseblöckchen wurden mit Hilfe einer sterilen, umgebogenen Pasteurpipette aus der Platte in ein steriles Schälchen, das die Lösung II (0,5 M EDTA, 0,01 M Tris/HCl pH 8) enthielt,

ohne Substanzverlust sanft eingebracht. Die Schälchen wurden für 1 Stunde bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Danach wurde Lösung II abgesaugt und die Agaroseblöckchen in Lösung III (1 % N-Lauroylsarkosin, 0,1 % Proteinase K aus Tritirachium album von Boehringer Mannheim, 0,5 M EDTA pH 9, 0,01M Tris/HCl pH 8) bei 50°C über Nacht inkubiert. Nach Absaugen von Lösung III wurden die Agaroseblöckchen entweder mit 0,5 M EDTA pH 9 überschichtet und bei 4°C aufbewahrt. Die für den S1 Verdau bestimmten Lysate wurden jedoch über Nacht bei 4°C dialysiert in 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid in Isopropanol zur Inhibierung von Proteinase) bei mehrfachem Wechsel des Dialysepuffers. Die Aufbewahrung der solchermaßen behandelten Lysate erfolgte dann auch in diesem Puffer bei 4°C.

6.3. Plasmidisolierung

6.3.1. Kompetenzentwicklung der E. coli-Zellen

Die Kompetenzentwicklung von E. coli erfolgte nach der von Lederberg und Cohen (Lederberg und Cohen 1974) beschriebenen Methode. Mit 0,5 ml Übernachtskultur des Empfängerstammes E. coli HB 101 wurden 50 ml LB-Medium (0,5% Yeast extract, 1% Bacto Tryptone, 0,5% Natriumchlorid, pH 7,5) beimpft und bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,6$) angezogen. Nach zehnmütiger Abkühlung der Zellen auf Eis wurden sie in der Sorvall-Zentrifuge geerntet (15 min, 4°C, 6000 Upm). Das Pellet wurde in 50 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert, wie oben zentrifugiert, in 40 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2,5 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert, in 0,2 ml Aliquots aufgeteilt, mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 15% versetzt und bei -70°C eingefroren.

6.3.2. Transformation von E. coli-Zellen nach Lederberg und Cohen (Lederberg und Cohen 1974)

Zu den in Eis aufgetauten kompetenten E. coli HB 101-Zellen wurde 1 µg YE p 2 Plasmid-DNS gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation in Eis wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten bei 42°C im Wasserbad erhitzt und anschließend für 10 Minuten im Eis gehalten. Nach einer 1:10 Verdünnung mit sterilem LB-Medium wurde die Zellsuspension 60 Minuten bei 37°C im Rollerschrank bebrütet. Ein 0,2 ml Aliquot wurde auf LB-Medium mit 20 µg/ml Tetrazyklin ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die auf diesem Selektivmedium hochgewachsenen Kolonien sind mutmaßlich auf Grund des aufgenommenen YE p 2-Plasmids tetrazyklinresistent geworden.

6.3.3. Plasmidisolierung aus E. coli (Triton-Methode)

Von einer Kolonie, d.h. einem Transformandenklon, wurde eine 5 ml Übernachtskultur mit Tetrazyklin angesetzt. Mit dieser Übernachtskultur wurden 500 ml tetrazyklinhaltiges (20 µg/ml) LB-Schüttelmedium in einem 2 Liter-Kolben beimpft und unter starkem Schütteln zur

guten Belüftung bis zu einer Zelldichte von $6-7 \times 10^8$ Zellen/ml angezogen. Die Plasmidzahl wurde dann durch Zugabe von Chloramphenicol (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) amplifiziert. Zellwachstum erfolgte dann über Nacht weiter bis zur stationären Wachstumsphase. Die Zellen wurden im GS 3-Rotor der Sorvall-Zentrifuge für 15 Minuten bei 7000 Upm abzentrifugiert und das Zellpellet in 2,5 ml Tris-Sucrose-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 25% Sucrose) resuspendiert. Zur Suspension wurden 0,45 ml Lysozym (5mg/ml) gemischt und anschließend wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,9 ml Tris-EDTA-Puffer (0,25 M Tris/HCl pH 8,0; 0,25 M EDTA) wurde die Suspension weitere 5 Minuten bei 0°C gehalten, anschließend mit 3,6 ml M-Stet-Puffer (0,5% Sucrose, 5% Triton 100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) vermischt und für 60 Minuten bei 15000 Upm im SS 34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und mit einer Ethidiumbromidlösung (Stammlösung 10 mg/ml) auf eine Ethidiumbromidkonzentration von 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Es erfolgte die Zugabe von 0,903 g CsCl pro ml Lösung. Die Röhrchen wurden im Ti 75 Rotor in der Beckman L 8-Ultrazentrifuge 67 Stunden (48h) bei 5°C und 36000 Upm (38000 Upm) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Plasmidbande mit einer 2 ml-Spritze aus dem Dichtegradienten abgezogen und 2 Stunden gegen Tris-EDTA-Dialyse-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,1 mM EDTA) dialysiert. Das Plasmid wurde sodann gefällt, in TE-Puffer (0,25 M Tris/HCl pH 8,50 0,25 M EDTA) aufgenommen, phenolisiert, erneut gefällt, gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

6.4. Präparation einer Lambda-Ladder

50 μg Lambda-DNS (BRL) wurden in 100 μl Annealing-Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.5) für 10 Minuten bei 55°C inkubiert, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und in 1 ml 1 % low melting point Agarose in 0,125 M EDTA eingegossen.

7. Enzymreaktionen

7.1. Restriktionsschnitte von DNS mit den Restriktionsendonucleasen Eco RI, Hind III, Hae I und Pst I zu analytischen Zwecken erfolgten stets nach Herstellerangaben (Boehringer Mannheim) in Volumina von 20-100 μl bei 37°C über Nacht.

7.2. Einführen von Einzelstrangbrüchen in das Plasmid pBR322 mit Hilfe von DNase I
1 μg linearisiertes Plasmid pBR 322 wurde mit 2 ng DNase I in 0,05 M Tris/HCl pH 7,2, 0,01 M MgSO_4 , 0,1 mM Dithiothreitol und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rinderserumalbumin für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit EDTA bei einer Endkonzentration von 20 mM gestoppt. Es folgten Phenol- und Chloroformextraktion und Fällung der DNS. S1 Verdau schloß sich an.

7.3. Sl Nuclease-Behandlung

DNS aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen wurde mit Sl-Salzen (Endkonzentration 3,3 mM Natriumacetat, 5 mM NaCl, 3 uM ZnSO₄ pH 4,5), NaCl (Endkonzentration 0,2 M) und 1 unit Sl Nuclease (aus *Aspergillus oryzae*, Boehringer Mannheim) pro ug DNS für 30 Minuten bei 37°C oder 10 U/ug für 30 Minuten inkubiert, die Reaktion mit EDTA zu einer Endkonzentration von 20 mM auf Eis gestoppt, der Inkubationsansatz mit 0,5 Volumen-teilen Agarose beads (0,2% Agarose; 14% Glycerin; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 40% Bromphenolblau) versetzt und die Probe in die Geltaschen einpipetiert. Die Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, daß doppelsträngige DNS des Bakteriophagen Lambda nicht, einzelsträngige DNS des Bakteriophagen M 13 dagegen vollständig von der einzelstrangspezifischen Sl Nuclease abgebaut wurde.

Der Sl-Verdau von Hefe-Lysaten erfolgte mit 10 U/150 ul Lysat in Gegenwart von 1xSl-Salzen und in geschmolzener low-melting Agarose bei 37°C und pH 4,5 für 30 Minuten, soweit nicht anders angegeben. Die Reaktion wurde mit 20 mM EDTA gestoppt und das Reaktionsgemisch in die Taschen eines Gels eingegossen.

7.4. Maltase-Reaktion

Maltase-Stammlösung (35 mU/ul) wurde 100fach verdünnt. 100 ul dieser Lösung wurde mit 900 ul 0,1 M p-Nitrophenyl-glucosid versetzt und für 5 Minuten bei 32°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 ul 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt und die Extinktion der Lösung bei 400 nm in einem Zeiss-Spektralphotometer gemessen. Die optische Dichte der Lösung betrug 1,184. Um die optimale PMSF-Konzentration zur Inhibierung der Proteinase K herauszufinden, wurde eine Versuchsserie mit folgenden Ansätzen durchgeführt:

1 mg Proteinase K wurde in 1 ml 0,1 M pNPG (in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7) gelöst. 900 ul dieser Mischung wurden mit 100 ul PMSF in verschiedenen Verdünnungsstufen bei 32°C inkubiert. Sodann wurden 100 ul Maltase entsprechend 35 mU zugegeben, die Reaktion nach exakt 5 Minuten durch Zugabe von 500 ul 1 M Na₂CO₃ gestoppt und die Extinktion der Lösung bei 400 nm im Photometer gegen den Nullwert (PMSF in pNPG) gemessen. Sukzessive wurden jeweils eine bis mehrere Reaktionskomponenten durch die entsprechende Menge Phosphatpuffer ersetzt.

8. Agarose-Gelelektrophorese

8.1. Agarose-Gelelektrophorese

Gelfotografie und Densitometrie

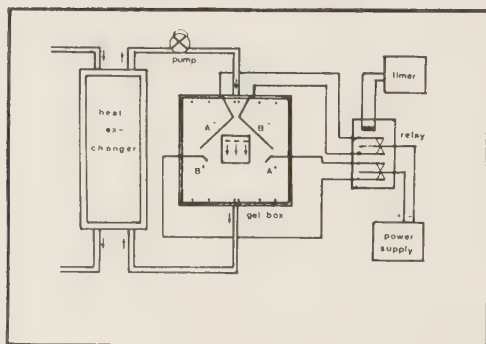
Die DNS-Proben wurden unbehandelt, nach Restriktions- und/oder Sl Nuclease-Verdau in die Taschen von horizontalen 0,7-1% Agarosegelen der Länge 24 cm einpipetiert. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose (Seakem FMC) in 1 x TBE (40mM Tris, 40 mM Borsäure, 20 mM EDTA) im Mikrowellenherd aufgekocht, der Flüssigkeitsverlust mit Wasser ausgeglichen, das Gel auf ca. 45°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (Stammlösung 1 mg/ml) auf eine Endkonzentration

von 0,25 μg Ethidiumbromid/ml gebracht und gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit demselben Puffer (1 x TBE, 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid) geflutet, die Proben in die Taschen einpipettiert und eine konstante Spannung von ca. 5 V/cm angelegt. Nach 8-12 Stunden war der Lauf beendet, das Gel wurde auf einem UV Transilluminator mit einer Linhof-Kamera fotografiert (Polaroidfilm Typ 665 und 667). Nicht Ethidiumbromid haltige Gele wurden nach Beendigung des Laufs in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt.

Gegebenenfalls wurden die Negative auf einem LKB-Laser-Densitometer, Modell Ultrosan XL, spurenweise abgemessen. Die Absorption wurde von einem Schreiber aufgezeichnet. Die Schwärzung des Films ist bei Einhaltung aller eingehenden Parameter der DNS-Menge proportional (Prunell et al. 1976; Zimmermann). Durch Integration der Flächen unter den ausgedruckten Kurven konnte somit eine Aussage über die DNS-Menge, d.h. die prozentuale Verteilung der DNS auf die einzelnen Banden, gemacht werden.

8.2. Orthogonal Field Alteration Gel Electrophoresis (OFAGE)

Die OFAGE-Apparatur wurde entsprechend den Angaben von Carle und Olson (Carle und Olson 1984) konstruiert. Die Länge der Kathoden betrug 16,8 cm, die der Anoden 2,3 cm, der Abstand zwischen Kathode und Anode jeweils 20,6 cm. Die beiden elektrischen Felder schlossen somit einen rechten Winkel ein. Das 10 x 10 cm große Agarosegel (50 ml 1,5 % Agarose in 0,4 x TBE) war entsprechend den Angaben von Carle und Olson (Carle und Olson 1984) positioniert mit dem Unterschied, daß das untere Gelende auf einer Linie mit den Anodenenden lag.



Schemazeichnung der verwendeten OFAGE Apparatur (nach Carle und Olson, 1984).

Der Puffer wurde mit einer Kreislumpumpe (Eheim, Typ 102101993 mit einer Kapazität von ca. 4 Litern/Minute) über ein Julabo-Thermostat-Kühlbad umgewälzt und dadurch auf eine Temperatur von 11°C konstant gehalten, da sich die Apparatur zusätzlich im Kühlraum befand. Die Spannung während des Laufs betrug 300V, die Stromstärke schwankte von 0,19 A zu Beginn des Laufs bis etwa 0,21 A am Ende. Die Laufzeit betrug 18 h bei

einer Pulsfrequenz von 50 Sekunden bzw. 14 h bei einer Pulsfrequenz von 10 Sekunden (s.auch spezifische Angaben in der Beschreibung der einzelnen Versuche). Die Gele wurden in 300 ml 0,4 x TBE-Puffer, der mit 30 µl Ethidiumbromid einer Stammlösung von 1 mg/ml versetzt worden war, für 1 Tag gefärbt und anschließend für 1 Tag in 0,5 x TBE-Puffer entfärbt.

9. Southern-Hybridisierung (Southern 1975)

9.1. Blotting von Gelen auf Nitrocellulosepapier

Zur Depurinierung der DNS wurde das Gel für 40 Minuten in 0,25 N Salzsäure leicht bewegt, anschließend die DNS 30 Minuten in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert und schließlich 20 Minuten in Southern-Transfer-Puffer (1 M Ammoniumacetat, 0,02 M NaOH) inkubiert. Das Gel wurde mit 5-10 ml des obigen Transferpuffers bedeckt. Auf das Gel wurde der passend zugeschnittene, mit Wasser und daraufhin mit Transferpuffer benetzte Nitrocellulose-Filter gelegt. Darüber kam ein in Transferpuffer getränktes und ein trockenes Whatman 3 MM-Filterpapier und oben darauf ein Stapel Zellstofftücher. Der Aufbau wurde mit einer Glasplatte und einem wassergefüllten, vollen 5 Liter-Kanister über Nacht beschwert. Wenn ein sog. Sandwich-Transfer vorgenommen wurde, so wurde derselbe Aufbau auf der unteren Gel-seite spiegelbildlich zum oberen aufgeschichtet. Das dehydrierte Gel wurde von den Nitrocellulosepapieren getrennt und eventuell nochmals in einer Ethidiumbromidlösung nachgefärbt zur Überprüfung auf Vollständigkeit des Transfers. Der Filter wurde kurz in 1 x Waschpuffer (0,3 M NaCl; 18 mM NaH₂PO₄; 20 mM NaOH; 2 mM EDTA) gewaschen, 2 Stunden bei 80°C im Trockenschrank gebacken und erneut in 1 x Waschpuffer gewaschen.

9.2. Radioaktive Markierung durch Nick-Translation mit Nick Translation Kit von Amersham

20 uCi ³²P-dCTP wurde in Methanol/Trockeneis gefroren und im Vakuum getrocknet. 1 µg Plasmid wurde mit 20 µl Amersham Nick Translation Puffer (dGTP, dTTP, dATP) versetzt und dieser Ansatz auf das trockene d⁺CTP aufgebracht. Mit Wasser wurde auf ein Volumen von 90 µl aufgefüllt, 10 µl Amersham Nick-Translation-Enzymlösung (DNS-Polymerase I) zugegeben, mit der Pipette gemischt und 2,5 Stunden bei 15°C inkubiert. Der Nick-Translation-Ansatz wurde dann mit 150 µl 50 mM EDTA versetzt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine Biogel P60-Säule mit einem Volumen von 5 ml. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide in die Plasmid-DNS wurde durch Szintillationsmessung über Cerenkov-Strahlung und im ³²P-Kanal kontrolliert. Er lag durchschnittlich bei 40-60 Millionen Ipm/µg DNS.

9.3. Prähybridisierung (Nygaard und Hall 1963; Southern 1975; Wahl et al. 1979)

Die Prähybridisierung erfolgte über Nacht mit einem Prähybridisierungsmix bestehend aus 10 % Dextranulfat, 1 % SDS, 1 M NaCl, 0,7 % Magermilchpulver in einem Kunststoffrohr im 65°C temperierten Hybridisierungssinkubator.

- 9.4. Hybridisierung (Nygaard und Hall 1963; Southern 1975; Wahl et al. 1979)
Der Nick-Translation-Ansatz wurde für 5-10 Minuten auf 100°C erhitzt, abgeschreckt und mit dem Prähybridisierungsmix vereinigt. Die Hybridisierung erfolgte in einem Kunststoffrohr in einem auf 65°C temperierten Hybridisierungsinkubator über Nacht. Die Filter wurden den Rohren entnommen und unter konstantem Schütteln zweimal mit 100 ml 2xSSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Na-Citrat pH 7,5) je 5 Minuten bei Raumtemperatur, zweimal mit 200 ml 2xSSC und 1 % SDS bei 65°C für 30 Minuten und zweimal mit 100 ml 0,1xSSC bei Raumtemperatur 30 Minuten lang gewaschen. Das Trocknen des Filters erfolgte dann entweder bei Raumtemperatur oder bei 80°C für 4 Stunden im Trockenschrank zwischen Whatman-Filterpapieren. Der Nitrocellulose-Filter wurde in Klarsichtfolie verpackt und bei -70°C zusammen mit einem Röntgenfilm (Fuji X-Ray Film RX, NIF, Medical) und Curix-Verstärker-Folie (Curix MR 80, 24 x 18, Cawo SE 6) 1-5 Tage exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte in der automatischen Filmentwicklungsmaschine Gewamatic. Gegebenenfalls wurden diese Autoradiogramme mit dem LKB-Densitometer spurenweise abgemessen und die Flächen der ausgedruckten Kurven integriert.

10. Indirekte-End-Markierung
Hierzu wurde aus unbestrahlten und bestrahlten Hefe-Zellen die gesamtgenomische DNS nach der Methode von Davis et al. (1980) isoliert, mit der Restriktionsendonuclease EcoRI nachgespalten, auf einem konventionellen, 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Filter gebロットet. Die Hybridisierung des Filters erfolgte mit dem jeweiligen mit ^{32}P radioaktiv markierten Plasmidfragment.

11. Herstellung von Heteroduplex-M13-DNS

11.1. Präparation von M13-Einzelstrang-DNS

a) Präparation von Phagenstocks

Eine frische Übernachtskultur des Bakterienstammes BMH71-18 wurde in PB-Medium (1,5 g Bacto Beef extract DIFCO, 1,5 g Bacto Yeast extract DIFCO, 5 g Bacto Pepton DIFCO, 1 g Bacto Dextrose DIFCO, 3,5 g NaCl, 3,68 g K_2HPO_4 , 1,32 g KH_2PO_4 auf 1 Liter) 1:100 verdünnt. In diese Kultur wurde ein von einer Transfektion oder Titration stammendes, von der Platte mittels einer Kapillarpipette gepicktes Plaque eingeblasen und über Nacht bei 37°C gerollt. 1,5 ml dieser Kultur wurden in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsröhrchen 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde als Phagenstock bei 4°C gelagert.

Te 200 μl der im E. Coli-Stamm BMH71-18 gewachsenen Phagensuspensionen der Stämme M13mp2, M13mp2ser11, M13mp2oc11, M13mp2op11 und M13cg5 3 wurden in einem 1 Liter-Kultur-gefäß mit 2 ml einer Übernachtskultur des Stammes BMH71-18 in 200 ml PB-Medium vereint und über Nacht bei 37°C stark geschüttelt.

b) Bestimmung des Phagentiters

Die Phagentiterbestimmung (in "plaque forming units" pfu/ml) und Kontrolle auf die Richtigkeit der jeweiligen Codonen 1 wurde auf EHA-Platten (13 g Bacto Trypton DIFCO, 8 g NaCl, 10 g Bacto Agar DIFCO, 2 g Natriumcitrat $\times$ 2H₂O pro Liter unter Zusatz von 7 ml steriler 20% Glucose) ausgeführt. Hierzu wurden den o.g. 200 ml Phagenkulturen je 1 ml entnommen, zentrifugiert und das Zellpellet mit 20 mM Natriumphosphatpuffer PH 7,2 und 0,002% Gelatine auf eine Konzentration von 10^{-8} und 10^{-9} verdünnt. Von diesen Phagenverdünnungen wurden je 100 μ l in 2,5 ml 45°C warmen Top-Agar (10 g Bacto Trypton DIFCO, 5 g NaCl, 6,5 g Bacto Agar DIFCO pro Liter) eingebracht, dem 2 Tropfen einer frischen Übernachtskultur des E. Coli-Stammes BMH71-18 zugesetzt worden waren und der 25 μ l einer 4% Lösung des Farbstoffs x-gal (5-Dibromo-4-chloro-3-Indolylgalactosid in Dimethylformamid) enthielt. Diese Mischung wurde augenblicklich auf einer IPTG (Isopropylthiogalactosid)-haltigen EHA Platte verstrichen.

c) Präparation von viraler M13-Einzelstrang-DNS

Die verschiedenen 200 ml BMH71-18 Kulturen, die wie unter 11.1.a) beschrieben angezogen und mit den unterschiedlichen Phagen transfiziert worden waren, wurden in sterilen 250 ml-Zentrifugenbechern bei 4°C und 10000 Upm in der Sorvall-Zentrifuge im Rotor GSA 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand in neue Plastikbecher überführt und mit 8 g Polyethylenglycol PEG 6000 und 6 g NaCl (Endkonzentration 0,5 M) versetzt. Nach der Lösung dieser Feststoffe wurde die Mischung für 2 Stunden bei 4°C gehalten. Die danach präzipitierten Phagen wurden durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 10000 Upm im GSA- Sorvall-Rotor gesammelt. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und verworfen. Das Pellet wurde in 24 ml TES-Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert, in einen 50 ml-Zentrifugenbecher überführt, mit 6 ml 10% PEG 6000, 2,5 M NaCl-Lösung versetzt und für 15 Minuten bei 4°C stehengelassen. Die präzipitierten Phagen wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 15000 Upm im SS34-Sorvall-Rotor geerntet. Wiederum wurde der Überstand sorgfältig entfernt und verworfen. Das Phagenpellet wurde in 2 ml TES-Puffer resuspendiert und mit demselben Puffer gewaschen. Es schlossen sich eine Phenolextraktion und eine Phenol/Chloroform-Extraktion an, gefolgt von dreimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mit Diethylether. Verbliebener Ether wurde durch 15 minütige Inkubation bei 65°C vertrieben. Die DNS wurde mit Ehtanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in 2 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,25 mM EDTA) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 260 nm im Photometer.

11.2. Präparation von M13mp2rev RF DNS

Aus den verschiedenen Phagen, gewachsen auf Stamm BMH 71-18 mit einem Phagentiter von 10^{12} pfu/ml wurden je 75 ml Phagensuspension präpariert. 5 x 25 ml einer frischen Übernachtskultur von Stamm BMH71-18 wurden in je 1 Liter PB-Medium in 2 l-Erlenmeyer-Flaschen inokuliert. Hatten die Kulturen, die bei 37°C geschüttelt wurden, eine OD_{546} von 0,5-0,6, wurden sie mit je 25 ml der 5 verschiedenen Phagensuspensionen infiziert und erneut 3-4 Stunden geschüttelt. Die Zellen wurden durch 30 minütiges Zentrifugieren geerntet und die Pellets auf Eis in je 22,5 ml 25% Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgeschlämmt, mit je 6 ml einer Lysozym-Lösung (5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl pH 8,0) versetzt und 10 Minuten bei 0°C sanft bewegt. Nach Zusatz von 7,5 ml 250 mM EDTA pH 8, erneuter 10 minütiger Inkubation bei 0°C unter vorsichtigem Schütteln wurden 27 ml DOC-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1% Brij 58 (Polyethylenglykolmonostearylether), 0,4% Natriumdeoxycholat, 62,5 mM EDTA) zugegeben und die Mischung 10 Minuten lang auf Eis bewegt. Eine 60 minütige Zentrifugation bei 27000 Upm und 4°C in einer Beckman-Ultrazentrifuge im Rotor 30 schloß sich an. Die klaren Lysate, d.h. die Überstände, wurden vereinigt und mit 0,97 g CsCl und 20 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro ml Überstand versetzt. Die Lösungen wurden jeweils in zwei 35 ml-Polyallomer Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen überführt, austariert, verschweißt und 15 Stunden bei 45000 Upm und 15°C im VTi50-Beckman-Rotor zentrifugiert. Die unterste Bande, die die Supercoil-DNS enthielt, wurde im UV-Licht mit einer Spritze (weitlumige Nadel) abgezogen in einem Volumen von ca 5 ml pro Gradient. Diese 5 ml CsCl-DNS-Lösung wurden in 5 ml Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen gefüllt und erneut 8 Stunden lang bei 45000 Upm und 15°C im Beckman-VTi65- Rotor zentrifugiert. Die untere Bande wurde, wie schon beschrieben, mit einer Spritze isoliert, 1:1 mit TE Puffer verdünnt und mit Ethanol gefällt. Die gefällte, gewaschene und getrocknete DNS wurde in TE-Puffer gelöst und 3 Mal mit Phenol extrahiert. Phenolreste wurden mit Diethylether entfernt, der Ether bei 65°C verflüchtigt. Es schloß sich eine Dialyse gegen das 1000fache Volumen einer Lösung aus 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA bei mehrmaligem Pufferwechsel an. Danach wurde der DNS-Gehalt der Lösung im Photometer bei 260 nm bestimmt.

11.3. Umklonierung von M13cg5Δ3

Nach 2.15.2. präparierte doppelsträngige DNS des Phagen M13cg5Δ3 wurde mit dem Restriktionsenzym Pvu II verdaut. Der Restriktionsansatz wurde in die Tasche eines 1% low gelling point-Agarosegels eingebracht und bei 4°C aufgetrennt. Lauf- und Gelpuffer waren 50 mM Natriumacetat pH 7,5, 1 mM EDTA. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht das 268 bp-große Pvu II-lacZ-Fragment ausgeschnitten. Das Agaroseblöckchen wurde 1:1 mit 0,1 M Tris-Acetate-Puffer pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5 M NaCl versetzt, vorsichtig zerkleinert und bei 65°C geschmolzen. Die Mischung

wurde mit demselben Volumen trisgesättigtem Phenol 20 Minuten gerollt und 10 Minuten bei 15000g abzentrifugiert. Dabei sammelte sich die Agarose in der Interphase. Die wäßrige obere Phase wurde mit Phenol reextrahiert, 2 mal mit Diethylether ausgeschüttelt und die DNS mit Ethanol gefällt. Die DNS-Konzentration wurde in einem Agarosegel bestimmt.

0,5 µg dieses Pvu II-Fragmentes wurden mit 1 µg einzelsträngiger M13mp2opl1-DNS in 300 µl H₂O vereinigt, 10 Minuten bei 70°C inkubiert, die Lösung auf eine Endkonzentration von 1xSSC (15 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl) eingestellt und anschließend 20 Minuten bei 65°C inkubiert.

Der Stamm BMH71-18 wurde nun mit 1 µg der mit Hilfe dieses Protokolls hergestellten Hybrid-DNS transformiert. Hierzu wurden in 2 x 5 ml PB-Medium einmal 200 µl (A) und einmal 1 Tropfen (B) einer frischen Übernachtskultur dieses Stammes inokuliert und 3 Stunden geschüttelt. Kultur A wurde sanft abzentrifugiert, in 1/2 Volumen steriler, eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 Minuten auf Eis gestellt. Wiederum wurde abzentrifugiert (2 Minuten, 7000g), die Zellen in 1/10 Volumen kaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen und 40 Minuten auf Eis gehalten. Es folgte ein 3 minütiger Hitzeschock bei 42°C, dem sich die Zugabe von 1 µg Hybrid-DNS zu den auf Eis gestellten kompetenten Zellen anschloß. Sodann wurden 200 µl von Kultur B zugegeben. Phagentiterbestimmung erfolgte wie unter 11.1.b) beschrieben. M13mp2Δ3-Klone wurden als blaue Plaques auf IPTG/x-gal-Indikatorplatten identifiziert und gepickt.

11.4.

Konstruktion von ndDNS

Die Konstruktion und Reinigung der die Basenfehlpaa- rungen enthaltenden nicked duplex DNS (ndDNS) wurde durchgeführt wie unter (Kramer et al. 1984) beschrieben. Je 20 µg doppelsträngige DNS aller Phagen wurden mit Ban II linearisiert. Die Ban II-Linearen wurden mit 50 µg der entsprechenden einzelsträngigen DNS gemischt, in 300 µl 1xSSC (150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat) 3 Minuten auf 100°C erhitzt und für 7 Minuten bei 65°C inkubiert.

Es wurden folgende Ansätze gewährt:

RF dsDNS

ssDNS

M13mp21eu11	M13mp21eu11
M13mp2ser11	M13mp2opl1
M13mp21eu11	M13mp2ocl1
M13mp2ser11	M13mp2ocl1
M13mp2ocl1	M13mp2ser11
M13mp2opl1	M13mp2 3

Die Trennung der verschiedenen DNS-Moleküle erfolgte durch Sedimentationszentrifugation im Beckman-SW41-Rotor bei 30000 Upm, 15°C über 15 Stunden im Saccharose Gradienten. Diese wurden durch Einfrieren und langsames Auftauen einer 18,5% Saccharose-Lösung in 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 20 µg/ml Ethidiumbromid in Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen von Beckman hergestellt. Die ndDNS-Bande wurde im UV-Licht abgezogen und die DNS, ein Gemisch von ndDNS und linearer DNS, durch Ethanol-fällung und Phenol- und Ether-extraktion gereinigt.

11.5. S1 Nuclease-Verdau der ndDNS

Die 6 verschiedenen ndDNS-Arten wurden mit Pvu II verdaut und das 300 bp große Pvu II-lacZ-Fragment aus dem low gelling point-Agarosegel isoliert, in dem Codon 11 und damit die Fehlpaarungs- und Loop-Konstruktionen liegen. Diese Fragmente wurden kinasiert (Maniatis et al. 1982), indem sie in 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Spermidin, 0,1 mM EDTA zusammen mit 2 units Polynucleotid-Kinase und 5 uCi ³²P γ -ATP für 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde mit 1 ul 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Phenolextraktion und Ethanol-fällung schlossen sich an. Es folgte der S1 Nuclease-Verdau nach dem Standard-Protokoll. Die Proben wurden mit 5 ul Formamid-Bromphenol Xylen-cyanol-Farbstoff versetzt, 5 Minuten auf 90°C erhitzt und auf ein 4%iges, 1 mm starkes denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Herstellung des Polyacrylamidgels erfolgte durch Versetzen von 10 ml 50% Acrylamid (19:1) mit 12,5 ml 10xTBE-Puffer und 53,5 g Harnstoff. Es wurde auf 125 ml mit Wasser aufgefüllt, der Harnstoff unter ständigem Schütteln gelöst und die Mischung filtriert. Nach Zusatz von 187,5 ul einer 25% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 125 ul TEMED-Lösung (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) wurde das Gel zwischen zwei 40 cm lange Glasplatten luftblasenfrei eingegossen, die durch Abstandshalter getrennt waren. Die Polymerisierung benötigte ca. 15 Minuten. Danach wurde das Gel mit den Glasplatten in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt. Die Taschen wurden mit Kapillarspritzen mit 1xTBE-Puffer ausgespült, mit 5 ul der Formamid-Farbstofflösung beladen und ein Vorlauf bei 35 V für 1/2 Stunde gestartet. Sodann wurden die vorbereiteten Proben aufgetragen und bei 35 V in 2 Stunden aufgetrennt. Eine Glasplatte wurde entfernt, das Gel in Klarsichtfolie gewickelt und in einer Kassette mit einem Röntgenfilm bei Raumtemperatur exponiert.

LITERATUR

Adams G.E.

Pulse Radiolysis in Radiobiology

Current Topics in Rad. Re.s, 3, 37-93, (1967)

Almer A., Hörz W.

Nuclease Hypersensitive Regions with Adjacent Positioned Nucleosomes Mark the Gene Boundaries of the PHO5/PHO3 Locus in Yeast

The EMBO J., 5, No. 10, 2681-2687, (1987)

Almer A., Rudolph H., Hinnen A., Hörz W.

Removal of Positioned Nucleosomes from the Yeast PHO5 Promoter upon PHO5 Induction Releases Additional Upstream Activating DNA Elements

The EMBO J., 5, No. 10, 2689-2696, (1986)

Ando T.

A Nuclease Specific for Heat-Denatured DNA Isolated from a Product of *Aspergillus oryzae*

Biochim. Biophys. Acta, 114, 158-168, (1966)

Andrews B.J., Proteau G.A., Beatty L.G., Sadowski P.D.

The FLP Recombinase of the 2 μ m Circle DNA of Yeast: Interaction with Its Target Sequence

Cell, 40, 795-803, (1985)

Andrews J., Martin-Bertram H., Hagen U.

S1 Nuclease Sensitive Sites in Yeast DNA: An Assay for Radiation-Induced Base Damage

Int. J. Radiat. Biol., 45, No.5, 497-504, (1984)

Bak H.L., Christansen C., Christansen G.

Circular, Repetitive DNA in Yeast

Biochem. Biophys. Acta, 269, 527-530, (1972)

Baker T.I.

Inducible Nucleotide Excision Repair in *Neurospora*

Mol. Gen. Genet., 190, 295-299, (1983)

Ballario P., Filetici P., Junakovic N., Pedone F.
Extrachromosomal Circular Copies in *Saccharomyces cerevisiae*

FEBS Lett., 155, No.2, 225-229, (1983)

Barendsen G.W., Gaiser J.F.

Cell Transformation in Vitro by Neutrons of Different Energies: Implications for Mechanisms

Rad. Protection Dosimetry, 13, 145-148, (1985)

Baverstock K.F.

Abnormal Distribution of Double Strand Breaks in DNA After Direct Action of Ionizing Energy

Int. J. Radiat. Biol., 47, No.4, 369-374, (1985)

- Beggs J.D., Guerineau M., Atkins J.F.
Map of Restriction Targets in Yeast 2 Micron Plasmid
DNA Cloned on Bacteriophage-Lambda
Mol. Gen. Genet., 148, 287-294, (1976)
- Bekker M.L., Kabcev O.K., Akhmedcf A.T., Luchinka L.A.
Quantitative Characterization of Pyrimidin-Dimer Excision from UV-Irradiated DNA (Excision Capacity) by Cell-Free Extracts of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*
J. Bacteriol., 142, 322-324, (1980)
- Bell L., Byers B.
Occurrence of Crossed Strand-Exchange Forms in Yeast DNA during Meiosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3445-3449, (1979)
- Bergman L.W.
A DNA Fragment Containing the Upstream Activator Sequence Determines Nucleosome Positioning of the Transcriptionally Repressed PHO5 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol., 6, No. 7, 2298-2304, (1986)
- Billheimer F.E., Avers C.J.
Nuclear and Mitochondrial DNA From Wild-Type and Petite Yeast - Circularity, Length and Buoyant Density
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 739-744, (1969)
- Birnboim H.C., Doly J.
Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA
Nucl. Acid. Res., 7, 1513-1523, (1979)
- Boveri T.
Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren
Jena: J. Fischer, 1914
- Brash D.E., Haseltine W.A.
UV Induced Mutation Hotspots Occur at DNA Damage Hotspots
Nature, 289, 189-192, (1982)
- Bohr V.A., Hanawalt P.C.
Factors that Affect the Initiation of Excision-Repair in Chromatin
in "DNA Repair and Its Inhibition"
Collins A., Johnsopn R.T., Downes C.S. (eds)
IRL Press, Oxford, 109-125, (1984)
- Boram W.R., Roman H.
Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: A DNA Repair Mutation Associated with Elevated Mitotic Gene Conversion
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, No. 8, 2828-2832, (1976)

Broach J.R., Atkins J.F., McGill C., Chow L.
Identification and Mapping of the Transcriptional and
Translational Products of the Yeast Plasmid, 2 μ m Circle
Cell, 16, 827-839, (1979)

Broach J.R.
The Yeast Plasmid 2 μ m Circle
in "The Molecular Biology of the Yeast"
Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R. (eds.)
Cold Spring Harbor 1981

Broach J.R., Hicks J.
Replication and Recombination Functions Associated
with the Yeast Plasmid 2 μ m Circle
Cell, 21, 501-508, (1980)

Bryant P.E.
Enzymatic Restriction of Mammalian Cell DNA Using
PvuII and BamHI: Evidence for the Double-Strand Break
Origin of Chromosomal Aberrations
Int. J. Rad. Biol., 46, 57-65, (1984)

Budd M., Mortimer R.K.
Repair of Double-Strand Breaks in a Temperature Condi-
tional Radiation-Sensitive Mutant of *Saccharomyces*
cerevisiae
Mut. Res., 103, 19-24, (1982)

Cairns J.
The Origin of Human Cancer
Nature, 289, 353-357, (1981)

Calderon I.L., Contopoulou C.R., Mortimer R.K.
Isolation and Characterization of Yeast DNA Repair
Genes II. Isolation of Plasmids that Complement the
Mutations rad50-1, rad51-1, rad54-3, rad55-3
Curr. Genet. 7, 93-100, (1983)

Cameron J.R., Philippsen P., Davis R.W.
Analysis of Chromosomal Integration and Deletions of
Yeast Plasmids
Nucl. Acids Res., 4, 1429-1448, (1977)

Carle G.F., Olson M.
Separation of Chromosomal DNA Molecules from Yeast by
Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis
Nucl. Acids Res., 12, 5647-5664, (1984)

Carle G.F., Olson M.
An Electrophoretic Karyotype for Yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3756-3760, (1985)

Carrano A.V.
Chromosome Aberrations and Radiation-Induced Cell Death
Mut. Res., 17, 341-366, (1973)

Cartwright I.L., Abmayr S.M., Fleischmann G., Lowenhaupt K., Elgin S.C.R., Keene M.A., Howard G.C. Chromatin Structure and Gene Activity - The Role of Non-Histone Chromosomal Proteins, Review
CRC Crit. Rev. Biochem., 13, 1-86, (1982)

Cerutti P.
Measurement of Thymine Damage Induced by Oxygen Radical Species
in "DNA Repair - A Laboratory Manual of Research Procedures, Part A, Friedberg E.C., Hanawalt P.C. (eds)., Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 57-68, (1981)

Chadwick K.H., Leenhouts H.P.
The Molecular Theory of Radiation Biology
Springer Verlag, Berlin, (1981)

Chow T.Y.K., Resnick M.A.
The Identification of a Deoxyribonuclease controlled by the RAD52 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*
In UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., New Series Vol. II, Cellular Responses to DNA Damage
Friedberg E.C. Bridges B.A. (eds), Alan R. Liss Inc., New York, 447-455, (1983)

Ciriacy M.
Genetics of Alcohol Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Isolation and Genetic-Analysis of ADH Mutants
Mut. Res., 29, 315-326, (1975a)

Ciriacy M.
Isolation and Characterization of Further cis-Acting and trans-Acting Regulatory Elements Involved in the Synthesis of Glucose-Repressible Alcohol-Dehydrogenase
Mol. Gen. Genet., 176, 427-431, (1979)

Clark-Walker G.D.
Isolation of Circular DNA from a Mitochondrial Fraction from Yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 388-392, (1972)

Clark-Walker G.D., Miklos G.L.G.
Localization and Quantification of Circular DNA in Yeast
Eur. J. Biochem., 41, 359-365, (1974)

Clark-Walker, G.D.
Size Distribution of Circular DNA from Petite-Mutant Yeast Lacking Rho DNA
Eur. J. Biochem., 32, 263-267, (1973)

Cox B.S., Parry J.M.
The Isolation, Genetics and Survival Characteristics of Ultraviolet Light-Sensitive Mutants in Yeast
Mut. Res., 6, 37-55, (1986)

- Dambrosio S.M., Setlow R.B.
Enhancement of Postreplication Repair in Chinese Hamster Cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2396-2400, (1976)
- Dambrosio S.M., Aebersold P.M., Setlow R.B.
Enhancement of Postreplication Repair in Ultraviolet-Light-Irradiated Chinese-Hamster Cells by Irradiation in G2 or S-Phase
Biophys. J., 23, 71-78, (1978)
- Davis R.W., Cameron T.M., ST. John T.P., Scherer S., Padgett R.A.
Rapid DNA Isolations for Enzymatic and Hybridization Analysis
Meth. Enzym., 65, 404-411, (1980)
- Demple B., Karran P.
Death of an Enzyme - Suicide Repair of DNA
Trends Biochem. Sci., 8, 137-139, (1983)
- Denhardt D.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 641-652, (1966)
- Denhardt D.J., Dressler D., Ray D.S. eds.
Overview - Comparison of the Isometric and Filamentous Phages
"The single-stranded DNA phages", Cold Spring Harbor, New York, 645-655, (1978)
- Dewey W.C., Furman S.C., Miller H.H.
Comparison of Lethality and Chromosomal Damage Induced by X-Rays in Synchronised Chinese Hamster Cells In Vitro
Rad. Res., 43, 561-581, (1970)
- Dodgson J.B., Wells R.D.
Action of Single-Strand Specific Nucleases on Model DNA Heteroduplexes of Defined Size and Sequence
Biochem., 16, No.11, 2374-2379, (1977)
- Eckardt F., Moustacchi E., Haynes R.H.
On the Inducibility of Error-Prone Repair in Yeast in "DNA Repair Mechanisms", Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F. (eds), New York Academic, 421-423, (1978)
- Elgin S.C.R.
Chromatin Structure, DNA Structure
Nature, 300, 402-403, (1982)
- Elgin S.C.R.
Anatomy of Hypersensitive Sites
Nature, 309, 213-214, (1984)

- Fangman W.L.
Separation of Very Large DNA Molecules by Gel Electrophoresis
Nucl. Acids Res., 5, 653-665, (1978)
- Ferguson L.R., Cox B.S.
The Role of Dimer Excision in Liquid Holding Recovery of UV-Irradiated Yeast
Mut. Res., 69, 19-41, (1980)
- Fleer R., Nicolet C.M., Glenn A.P., Friedberg E.C.
RAD4 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular Cloning and Partial Characterization of a Gene that is Inactivated in *E. coli*
Mol. Cell. Biol., 7, No. 3, 1180-1192, (1987)
- Foote R.S., Mitra S., Pal B.C.
Demethylation of O-6-Methylguanine in a Synthetic DNA Polymer by an Inducible Activity in *Escherichia coli*
Biochem. Biophys. Res. Comm., 97, 654-659, (1980)
- Frankenberg D., Frankenberg-Schwager M., Blöcher D., Harbich R.
Evidence for DNA Double-Strand Breaks as the Critical Lesions in Yeast Cells
Rad. Res., 88, 524-532, (1981)
- Frankenberg D., Frankenberg-Schwager M.
Interpretation of the Shoulder of Dose-Response Curves with Immediate Plating in Terms of Repair of Potentially Lethal Lesions during a Restricted Time Period
Int. J. Rad. Biol., 39, No. 6, 617-631, (1981)
- Frankenberg-Schwager M., Frankenberg D., Blöcher D., Adamczyk C.
The Linear Relationship between DNA Double-Strand Breaks and Radiation Dose (30MeV Electrons)
Int. J. Radiat. Biol., 36, 261-270, (1979)
- Frankenberg-Schwager M., Frankenberg D., Blöcher D., Adamczyk C.
Repair of DNA Double-Strand Breaks in Irradiated Yeast Cells under Non-Growth Condition
Rad. Res., 82, 498-510, (1980)
- Frankenberg D., Kistler M., Eckardt-Schupp F.
Effect of Cellular Glutathione Content on the Induction of DNA Double Strand Breaks by 25MeV Electrons
Int. J. Rad. Biol., in press
- Franklin W.A., Haseltine W.A.
The Role of the (6-4)-Photoproduct in Ultraviolet Light-Induced Transition Mutations in *E. coli*
Mut. Res., 165, 1-7, (1986)

Friedberg E.C.

"DNA Repair"

W. H. Freeman, New York, (1985)

Friedberg E.C., Bonura T., Radany E.H., Love J.D.
in "The Enzymes", Boyer P.D. (ed), Third Edition,
Vol. XIV, Nucleic Acids, Part A, 251, Academic Press
New York, (1981)

Friedberg E.C., Lehman I.R.

Excision of Thymine Dimers by Proteolytic and Amber
Fragments of Escherichia coli DNA-Polymerase I
Biochem. Biophys. Res. Comm., 58, 132-139, (1974)

Friedberg E.C., Naumovski L., Yang E., Pure G.A.,
Schultz R.A., Weiss W., Love J.D.

Approaching the Biochemistry of Excision Repair in
Eukaryotic Cells: the Use of Cloned Genes from
Saccharomyces cerevisiae
in UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Series Vol, II,
Cellular Responses to DNA Damage, Friedberg E.C.,
Bridges B.A. (eds), Alan R. Liss Inc., New York,
63-75, (1983)

Furuno I., Yada T., Matsudaira H., Maruyama T.

Induction and Repair of DNA Strand Breaks in Cultured
Mammalian Cells Following Fast-Neutron Irradiation
Int. J. Rad. Biol., 36, 6, 639-648, (1979)

Futcher A.B.

Copy Number Amplification of the 2um Circle Plasmid of
Saccharomyces cerevisiae

J. Theoret. Biol., 119, 197-204, (1986)

Futcher A.B., Cox B.S.

Maintenance of the 2um Circle Plasmid in Population of
S. cerevisiae

J. Bact., 154, No.2, 612-622, (1983)

Game J.C.

Radiation-Sensitive Mutants and Repair in Yeast
"Yeast Genetics", Spencer J.F.T., Spencer D.M.,
Smith A.R.W. (eds.), Springer Series in Molecular
Biology, 109-137, (1983)

Game J.C., Cox B.S.

Synergistic Interactions Between rad Mutants in Yeast
Mut. Res., 20, 35-44, (1973)

Game J.C., Cox B.S.

Allelism Tests of Mutants Affecting Sensitivity to
Radiation in Yeast and a Proposed Nomenclature
Mut. Res., 12, 328-331, (1971)

Game J.C., Little J.G., Haynes R.H.
Yeast Mutants Sensitive to Trimethoprim
Mut. Res., 28, 175-182, (1975)

Game J.C., Mortimer R.K.
A genetic Study of X-Ray Sensitive Mutants in Yeast
Mut. Res., 24, 281-292, (1974)

Gerbaud C., Fournier P., Blanc H., Aigle M., Heslot H., Guerineau M.
High Frequency of Yeast Transformation by Plasmids Carrying Part of Entire 2um Yeast Plasmid
Gene, 5, 233-253, (1979)

Grote S.J.
Radiation-Induced Lethality and Genetic Damage in Mammalian Cells
PhD. Thesis, University of London, (1971)

Gubbins E.J., Newlon C.S., Kann M.D., Donelson J.E.
Sequence Organization and Expression of a Yeast Plasmid DNA
Gene, 1, 185-207, (1977)

Guerineau M., Grandchamp C., Paoletti C., Slonimski P.
Characterization of a New Class of Circular DNA Molecules in Yeast
Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 550-557, (1971)

Guerineau M., Grandchamp C., Slonimski P.
Circular DNA of a Yeast Episome with two Inverted Repeats: Structural Analysis by a Restriction Enzyme and Electron Microscopy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3030-3034, (1976)

Guerineau M., Slonimski P., Avner P.R.
Yeast Episome: Oligomycin Resistance Associated with a Small Covalently Closed Non-Mitochondrial Circular DNA
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 412-419, (1974)

Hagedorn R., Thielman H.W., Fischer H., Schroeder C.H.
SV40-Induced Transformation and T-Antigen Production is Enhanced in Normal and Repair-Deficient Human Fibroblasts after Pretreatment of Cells with UV-Light
J. Can. Res. Clin. Oncol., 106, 93-96, (1983)

Hagen U.
Grundlagen der Strahlenbiochemie
in "Handbuch der Nuklearmedizin", Band 1
Kriegel H. (ed.), G. Fischer Verlag, (1985)

Hagen U.
Current Aspects on the Radiation Induced Base Damage in DNA
Radiat. Environ. Biophys., 25, 261-271, (1986)

- Hagen U., Coquerelle T.
Correlation between Sedimentation Coefficient and Molecular-Weight of Denatured DNA
Biochim. Biophys. Acta, 374, 271-282, (1974)
- Hanawalt P.C.
Comparative Responses to DNA Damage in Bacteria and Mammalian Cells
in Basic Life Sciences, 38, "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms"
Shankel D.M. et al. (eds.), Plenum Press NY (1986)
- Hanawalt P.C., Cooper P.K., Ganesan A.K., Smith C.A.
DNA Repair in Bacteria and Mammalian Cells
Ann. Rev. Biochem., 48, 783-836, (1974)
- Haseltine W.A., Gordon L.K., Lindan C.P., Grafstrom R.H., Shaper N.L., Grossman L.
Cleavage of Pyrimidine Dimers in Specific DNA-Sequences by a Pyrimidine Dimer DNA-Glycosylase of *M. luteus*
Nature, 285, 634-641, (1980)
- Haseltine W.A.
Ultraviolet Light Repair and Mutagenesis, Revisited
Cell, 33, 13-17, (1983)
- Haynes R.H., Eckardt F.
Analysis of Dose-Response Patterns in Mutation Research
Can. J. Genet. Cytol., 21, 277-302, (1979)
- Haynes R.H., Kunz B.A.
DNA Repair and Mutagenesis in Yeast
"The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R. (eds.), Cold Spring Harbor, 371-414, (1981)
- Hentosh P., Henner W.D., Reynolds R.J.
Sequence Specificity of DNA Cleavage by *Micrococcus luteus* Gamma-Endonuclease
Rad. Res., 102, 119-129, (1985)
- Higgins D.R., Prakash S., Reynolds P., Polakowska R., Weber S., Prakash L.
Isolation and Characterization of the RAD3 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 80, 5680-5684, (1983)
- Higgins D.R., Prakash S., Reynolds P., Prakash L.
Molecular Cloning and Characterization of the RAD1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*
Gene, 26, 119-126, (1983)
- Hindley J.
DNA Sequences in a Cloned Restriction Fragment Containing Inverted Repeat Region from Yeast 2um Plasmid
FEBS Lett., 82, 121-124, (1977)

Ho K.S.Y.

Induction of DNA Double-Strand Breaks by X-Rays in a Radiosensitive Strain of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Mut. Res., 30, 327-334, (1975)

Ho K.S.Y., Mortimer R.K.

Two Mutations which Confer Temperature-Sensitive Radiation Sensitivity in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Mut. Res., 33, 157-164, (1975)

Hofstetter H., Schamböck A., van den Berg J., Weissmann C.

Specific Excision of Inserted DNA Segment from Hybrid Plasmids Constructed by Poly(dA).Poly(dT) Method
Biochim. Biophys. Acta, 454, 587-591, (1976)

Hollenberg C.P.

Mapping of Regions on Cloned *Saccharomyces cerevisiae* 2um DNA Coding for Polypeptides Synthesized in *E. coli* Minicells
Mol. Gen. Genet., 162, 23-34, (1978)

Hollenberg C.P., Borst P., Van Bruggen E.F.J.

Mitochondrial DNA 5. A 25um Closed Circular Duplex DNA Molecule in Wild-Type Yeast Mitochondria; Structure and Genetic Complexity
Biochem Biophys Acta, 209, 1-15, (1970)

Hollenberg C.P., Degelmann A., Kustermann-Kuhn B., Royer H.D.

Characterization of 2um DNA of *Saccharomyces cerevisiae* by Restriction Fragment Analysis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2072-2076, (1976)

Hollenberg C.P., Kustermann-Kuhn B., Royer D.H.

Synthesis of High Molecular-Weight Polypeptides in *Escherichia coli* Minicells Directed by Cloned *Saccharomyces cerevisiae* 2 Micron DNA
Gene, 1, 33-47, (1976)

Hollenberg C.P., Royer H.D.

Structure and Function of Yeast 2um DNA
J. Supram St., S3, 133, (1979)

Holliday R.

Further Evidence for an Inducible Recombination Repair System in *Ustilago maydis*
Mut. Res., 29, 149-153, (1975)

Hutchinson F.

Chemical Changes Induced in DNA by Ionizing Radiation
Progress in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol., 32, 115-154, (1985)

- Igo-Kemenes T., Hörz W., Zachau H.G.
Chromatin
Ann. Rev. Biochem., 51, 89-121, (1982)
- Iwatsuki N., Joe C.O., Werbin H.
Evidence that Deoxyribonucleicacid Photolyase from Bakers-Yeast is a Flavoprotein
Biochem., 19, 1172-1176, (1980)
- Jacobs A., Bopp A., Hagen U.
In Vitro Repair of Single-Strand Breaks in Gamma-Irradiated DNA by Polynucleotide Ligase
Int. J. Radiat. Biol., 22, 431-436, (1972)
- Jayaram M., Li Y.Y., Broach J.R.
The Yeast Plasmid 2um Circle Encodes Components Required for Its High Copy Propagation
Cell, 34, 95-104, (1983)
- Jayaram M., Li Y.Y., Broach J.R.
The Yeast Plasmid 2um Circle Encodes Components Required for Its High Copy Propagation
Cell, 34, 95-104, (1983)
- Joshi G.P., Nelson W., Revell S.H., Shaw C.A.
X-Ray Induced Chromosome Damage in Live Mammalian Cells and Improved Measurement of Its Effect on Their Colony-Forming Ability
Int. J. Radiat. Biol., 41, 161-181, (1982)
- Junker B., Martin-Bertram H., Hagen U.
Distribution of S1 Nuclease Sensitive Sites and Double Strand Breaks in Gamma-Irradiated Lambda-DNA
Int. J. Radiat. Biol., 46, 675-679, (1984)
- Johnston L.H., Naysmyth K.
Saccharomyces cerevisiae Cell-Cycle Mutant cdc9 is Defective in DNA-Ligase
Nature, 274, 891-893, (1978)
- Karran P., Lindahl T., Griffin B.
Adaptive Response to Alkylating-Agents Involves Alteration InSitu of O-6-Methylguanine Residues in DNA
Nature, 280, 75-78, (1979)
- Katcher H.L., Wallace S.S.
Characterization of the Escherichia coli X-Ray Endonuclease III
Biochem., 22, 4071-4081, (1983)
- Kessler B., Bopp A., Hagen U.
Radiation-Induced Single-Strand Breaks in Double-Stranded Circular DNA
Int. J. Radiat. Biol., 20, No.1, 75-78, (1971)

Khan N.A., Brendel M., Haynes R.H.
Supersensitive Double Mutants in Yeast
Mol. Genet., 107, 376-378, (1970)

Kiefer J.
Biologische Strahlenwirkung
Springer Verlag 1981

Klotz L.C., Zimm B.H.
Relaxation Phenomena as a Tool for Studying DNA
Abs. Pap. ACS, 1 ff, (1972)

Klotz L.C., Zimm B.H.
Size of DNA Determined by Viscoelastic Measurements -
Results on Bacteriophages, *Bacillus subtilis* and
Escherichia coli
J. Mol. Biol., 72, No. 3, 779-800, (1972)

Klotz L.C., Zimm B.H.
Retardation Times of Deoxyribonucleic Acid Solutions.
2. Improvements in Apparatus and Theory
Macromolecules, 5, No. 4, 471 ff, (1972)

Kornberg A.
DNA-Replication
Trends Biochem., 9, No. 4, 122-124, (1984)

Kow G.W., Wallace S.S.
Some Properties of *E. coli* Endonuclease III as Eluci-
dated by Kinetic Studies
Int. Conf. on Mechanism of DNA-Damage and Repair
Gaithersburg, MA, USA, (1985)

Kramer B.
Untersuchungen zur DNA-Mismatch-Reparatur in *E. Coli*
Dissertation, (1986)

Kramer B., Kramer W., Fritz H.-J.
Different Base/Base Mismatches Are Correlated with
Different Efficiencies by the Methyl-Directed DNA Mis-
match-Repair System of *E. coli*
Cell, 38, 879-887, (1984)

Kundu S.C., Mcens P.B.
The Ultrastructural Meiotic Phenotype of the Radia-
tion-Sensitive Mutant RAD6-1 in Yeast
Chromosoma, 87, 125-132, (1982)

Kunz B.A.
Studies of Induced Mitotic Recombination in
Saccharomyces cerevisiae
PhD Thesis, York University, Toronto, (1981)

Kunz B.A., Haynes R.H.
Phenomenology and Genetic Control of Mitotic Recombi-
nation in Yeast
Ann. Rev. Genet., 15, 57-89, (1981)

Kuo C.L., Campbell J.L.

Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* DNA Replication Genes: Isolation of the CDC8 Gene and Two Genes that Compensate for the cdc8-1 Mutation
Mol. Cell. Biol., 3, No. 10, 1730-1737, (1983)

Kupiec M., Simchen G.

Cloning and Mapping of the RAD50 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Gen. Genet., 193, 525-531, (1984)

Langley K.E., Villarejo M.R., Fowler A.V., Zamenhof P.J., Zabin I.

Molecular Basis of Beta-Galactosidase Alpha-Complementation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, No. 4, 1254-1257, (1975)

Lawrence C.W., Stewart J.W., Sherman F., Christensen R.
Specificity and Frequency of Ultraviolet-Induced Reversion of an Iso-1-Cytochrome c Ochre Mutant in Radiation Sensitive Strains of Yeast
J. Mol. Biol., 85, 137-162, (1974)

Lawrence C.W.

Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*
Adv. Genet., 21, 173-254, (1982)

Lawrence C.W., Christensen R.B.

The Mechanism of Untargeted Mutagenesis in UV-Irradiated Yeast
Mol. Gen. Genet., 186, 1-9, (1982)

Lawrence C.W., Das G., Christensen R.B.

REV7, a New Gene Concerned with UV Mutagenesis in Yeast
Mol. Gen. Genet., 200, 80-85, (1985)

Lawrence C.W., Nisson P.E., Christensen R.B.

UV and Chemical Mutagenesis in rev7 Mutants of Yeast
Mol. Gen. Genet., 200, 86-91, (1985)

Lederberg E.M., Cohen S.N.

Transformation of *Salmonella Typhimurium* by Plasmid DNA
J. Bact., 119, 1072-1074, (1974)

Lee M.G.

PhD. Thesis, C.N.A.A., London, (1983)

Lee M.G., Yarranton G.T.

Inducible DNA Repair in Simple Eukaryotes
Mol. Gen. Genet., 185, 245-260, (1982)

Lemontt J.

Mutants of Yeast Defective in Mutation Induced by Ultraviolet Light
Genetics, 68, 21-33, (1971)

- Livingston D.M.
Inheritance of the 2um DNA Plasmid from *Saccharomyces cerevisiae*
Genetics, 86, 73-84, (1977)
- Lindahl T.
DNA Repair Enzymes
Ann. Rev. Biochem., 51, 61-87, (1982)
- Lindahl T., Demple B., Robbins P.
Suicide Inactivation of the *Escherichia coli* O-6-Methylguanine DNA Transferase
The EMBO J., 1, 1359-1368, (1982)
- Little J.W., Mount D.W.
The SOS Regulatory System of *Escherichia coli* Cell, 29, 11-22, (1982)
- Livingston D.M., Klein H.L.
Deoxyribonucleic Acid Sequence Organization of a Yeast Plasmid
J. Bact., 129, 472-481, (1977)
- Livingston D.M., Kupfer D.M.
Control of *Saccharomyces cerevisiae* 2um DNA Replication by Cell Division Cycle Genes that Control Nuclear DNA Replication
J. Mol. Biol., 116, 249-260. (1977)
- Madhani H.D., Bohr V.A., Hanawalt P.C.
Differential DNA Repair in Transcriptionally Active and Inactive Proto-oncogenes: c-abl and c-mos
Cell, 45, 417-423, (1986)
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.
"Molecular cloning", Cold Spring Harbor, New York, 1982
- Mann C., Davis R.W.
Structure and Sequence of the Centromeric DNA of Chromosome 4 in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol., 6, No 1, 241-245, (1986)
- Martin-Bertram H.
SI Sensitive Sites in DNA after Gamma-Irradiation
Biochim. Biophys. Acta, 652, 261 ff, (1981)
- Martin-Bertram H., Hagen U.
Genomic Integrity of T1 DNA After Gamma- and Ultraviolet Irradiation
Biochim. Biophys. Acta, 561, 312-323, (1979)
- Martin-Bertram H., Hartl P., Winkler C.
Unpaired Bases in Phage DNA After Gamma-Irradiation In-Situ and In-Vitro
Rad. Environ. Biophys., 23, 95-105, (1984)

- Martin-Bertram H., Rumpf E., Winkler C.
Evidence for Radiation-Induced Bulky Lesions in DNA
Rad. Environ. Biophys., 21, 305-307, (1983b)
- Mathis D., Oudet P., Chambon P.
Structure of Transcribing Chromatin
Proc. Nucl. Acids Res. Mol. Biol., 24, 1-55, (1980)
- McCreedy S.J., Cox B.S.
Repair of 2um Plasmid DNA in *Saccharomyces cerevisiae*
Curr. Gen., 2, 207-210, (1980)
- McGrew J., Diehl B., Fitzgerald-Hayes M.
Single-Base-Pair Mutations in Centromere Element-III
Cause Aberrant Chromosome Segregation in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol., 6, (1986)
- McKee R.M., Lawrence C.W.
Genetic Analysis of Gamma-Ray Induced Mutagenesis in Yeast
I. Reversion in Radiation Sensitive Strains
Genetics, 93, (1979)
- McKee R.M., Lawrence C.W.
Genetic Analysis of Gamma-Ray Induced Mutagenesis in Yeast
II. Allele Specific Control of Mutagenesis
Genetics, 93, (1979)
- Mc Kee R.M., Lawrence C.W.
Genetic Analysis of Gamma-Ray Induced Mutagenesis in Yeast
III. Double Mutants
Mut. Res., 70, 37-48, (1980)
- Messing J., Gronenborn B., Müller-Hill B., Hofschneider P.H.
Filamentous Coliphage M13 as a Cloning Vehicle
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3642-3646, (1977)
- Meyhack B., Bajwa W., Rudolph H., Hinnen A.
2 Yeast Acid-Phosphatase Structural Genes are the Result of a Tandem Duplication and Show Different Degrees of Homology in Their Promoter and Coding Sequences
The EMBO J., 6, 675-680, (1982)
- Moustacchi E.
Cytoplasmic and Nuclear Genetic Events Induced by UV-Light in Strains of *Saccharomyces cerevisiae* with Different UV Sensitivities
Mut. Res., 7, 171-185, (1969)
- Mowat M.R.A., Jachymczyk W.J., Hastings P.J., v. Borstel R.C.
Repair of Gamma-Ray Induced DNA Strand Breaks in the Radiation-Sensitive Mutant rad18-2 of *S. cer.*
Mol. Gen. Genet., 189, 256-262, (1983)

- Nakabeppu Y., Sekiguchi M.
Physical Association of Pyrimidine Dimer DNA Glycosylase and Apurinic-Apyrimidinic DNA Endonucleases Essential for Repair of Ultraviolet-Damaged DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2742-2746, (1981)
- Natarajan A.T., Obe G.
Molecular Mechanisms Involved in the Production of Chromosomal Aberrations. I. Utilization of Neurospora Endonuclease for the Study of Aberration Production in G2 Stage of the Cell Cycle
Mut. Res., 52, 137-149, (1978)
- Natarajan A.T., Obe G., Van Zeeland A.A., Palitti F., Meijers M., Verdegaal-Immerzeel E.A.M.
Molecular Mechanisms Involved in the Production of Chromosomal Aberrations. II. Utilization of Neurospora Endonuclease for the Study of Aberration Production by X-Rays in G1 and G2 Stages of the Cell Cycle.
Mut. Res., 69, 293-305, (1980)
- Natarajan A.T., Obe G.
Molecular Mechanisms Involved in the Production of Chromosomal Aberrations. III. Restriction Endonuclease.
Chromosoma, Berlin, 90, 120-127, (1984)
- Naumovski L., Friedberg E.C.
Molecular Cloning of Eukaryotic Genes Required for Excision Repair of UV-Irradiated DNA: Isolation and Partial Characterization of the RAD3 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*
J. Bacteriol., 152, 323-331, (1982)
- Naumovski L., Friedberg E.C.
A DNA Repair Gene Required for the Incision of Damaged DNA is Essential for Viability in *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4818-4821, (1983)
- Naumovski L., Friedberg E.C.
Saccharomyces cerevisiae RAD2 Gene: Isolation, Subcloning, and Partial Characterization
Mol. Cell. Biol., 4, 290-295, (1984)
- Nelson R.G., Fangman W.L.
Nucleosome Organization of the Yeast 2µm DNA Plasmid: A Eukaryotic Minichromosome
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6515-6519, (1979)
- Nygaard A.P., Hall B.D.
A Method for Detection of RNA-DNA Complexes
Biochim. Biophys. Res. Comm., 12, No.2, 98-104, (1963)
- Oleinick N.L., Chiu S., Friedman L.R.
Chromatin Structure as a Factor in the Formation and Rejoining of Radiation-Induced Single Strand Breaks in Mammalian Cells
7. ICRR/B Amsterdam, (1983)

- Olsson M., Lindahl T.
Repair of Alkylated DNA in *Escherichia Coli*-Methyl-group Transfer from O6-Methylguanine to a Protein Cysteine Residue
J. Biol. Chem., 255, 10569-10571, (1980)
- Panzeri L.A., Philippsen P.
Centromeric DNA from Chromosome VI in *Saccharomyces cerevisiae* Strains
EMBO J., 1, No. 12, 1605-1611, (1982)
- Paterson M.C.
Ataxia telangiectasia: A Model Inherited Disease Linking Deficient DNA Repair with Radiosensitivity and Cancer Proneness
DNA Repair Mechanisms, ed. Hanawalt P.C., New York Academic Press, p. 637-650 (1978)
- Paterson M.C., Smith B.P., Lohman P.H.M., Anderson A.K., Fishman L.
Defective Excision Repair of Gamma-Ray-Damaged DNA in Human (Ataxia telangiectasia) Fibroblasts
Nature, 260, 444-447, (1976)
- Pawl G., Taylor R., Minton K., Friedberg E.C.
Kinetics of Thymine Dimer Excision From Phage-T4-DNA in Vivo
J. Mol. Biol., 108, 99-109, (1976)
- Petes T.D., Williamson D.H.
Replication Circular DNA Molecules in Yeast
Cell, 4, 249-253, (1975)
- Prakash L.
Repair of Pyrimidine Dimers in Nuclear and Mitochondrial DNA of Yeast Irradiated with Low Doses of UV-Light
J. Mol. Biol., 98, 781-795, (1975)
- Prakash L.,
Repair of Pyrimidine Dimers in Radiation-Sensitive Mutants *rad3*, *rad4*, *rad6* and *rad9* of *Saccharomyces cerevisiae*
Mut. Res., 45, 13-20, (1977)
- Prakash L.
Defective Thymine Dimer Excision in Radiation-Sensitive Mutants *RAD10* of *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Gen. Genet., 152, 125-128, (1977)
- Prakash L., Prakash S.
Isolation and Characterization of MMS-Sensitive Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
Genetics, 86, 33-55, (1977)

Prakash L.

Characterization of Postreplication Repair in *Saccharomyces cerevisiae* and Effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* Mutations
Mol. Gen. Genet., 184, 471-478, (1981)

Prakash L.

Effect of Genes Controlling Radiation Sensitivity on Chemically Induced Mutations in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics, 83, 285-301, (1976)

Prunell A., Strauss F., Leblanc B.

Photographic Quantitation of DNA in Gel-Electrophoresis
Analyt. Biochem., 78, 57-65, (1976)

Pulleyblank D.E., Haniford D.B., Morgan A.R.

A Structural Basis for S1 Nuclease Sensitivity of Double-Stranded DNA
Cell, 42, 271-280, (1985)

Reeves R.

Transcriptionally Active Chromatin
Biochim. Biophys. Acta, 782, 343-393, (1984)

Resnick M.A., Martin P.

The Repair of Double-Strand Breaks in the Nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and Its Genetic Control
Mol. Gen. Genet., 143, 119 ff., (1976)

Resnick M.A.

Induction of Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by Ultraviolet Light
Mut. Res., 7, 315-332, (1969)

Resnick M.A., Sugino A., Nitiss J., Chow T.

DNA Polymerases, Deoxyribonucleases, and Recombination During Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol., 4, 2811-2817, (1984)

Resnick M.A., Nitiss C.E., Malone R.

Meiosis Can Induce Recombination in *rad52* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
Genetics, (1986)

Reynolds R.J., Love J.D., Friedberg E.C.

Molecular Mechanisms of Pyrimidine Dimer Excision in *Saccharomyces cerevisiae* - Excision of Dimers in Cell-Extracts
J. Bacteriol., 147, 705-708, (1981)

Reynolds R.J., Friedberg E.C.

Molecular Mechanisms of Pyrimidine Dimer Excision in *Saccharomyces cerevisiae* - Incision of Ultraviolet-Irradiated Deoxyribonucleic Acid In Vivo
J. Bact., 146, 692-704, (1981)

Reynolds P., Weber S., Prakash L.
RAD6 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a
Protein Containing a Tract of 13 Consecutive Aspartates
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 168-172, (1985)

Royer D.H., Hollenberg C.P.
Saccharomyces cerevisiae 2um DNA
Mol. Gen. Genet., 150, 271-284, (1977)

Rydberg B.
Can DNA Double Strand Breaks in Mammalian Cells Be
Repaired without Help From a Homologous DNA Molecule
7. ICRR/B Amsterdam 1983

Saeki T., Machida I., Nakai S.
Genetic Control of Diploid Recovery after Gamma-Irra-
diation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Mut. Res., 73, 251-265, (1980)

Sancar A., Sancar G.B.
Escherichia Coli DNA Photolyase is a Flavoprotein
J. Mol. Biol., 172, 223-227, (1984)

Saunders G.W., Rank G.H., Kustermann-Kuhn B., Hollen-
berg C.P.
Inheritance of Multiple-Drug Resistance in
Saccharomyces cerevisiae
Mol. Gen. Genet., 175, 45-52, (1979)

Schäfer G., Haas P., Coquerelle Th., Hagen U.
Properties of an Endonuclease Activity in *Micrococcus*
luteus Acting on Gamma-Irradiated DNA and on Apurinic
DNA
Int. J. Rad. Biol., 37, No.1, 11-18, (1980)

Schild D., Konforti B., Perez C., Gish W.,
Mortimer R.K.
Isolation and Characterization of Yeast DNA Repair
Genes. I. Cloning of the RAD52 Gene
Curr. Genet., 7, 85-92, (1983)

Schild D., Mason K., Mortimer R.K.
Flp+ Dependent Loss of 2um DNA in rad52-1 and rad52-
Disruption Strains
Poster at the 12th Int. Conf. on Yeast Genetics and
Mol. Biol., Sept. 1984

Schorpp M., Mallick U., Rahmsdorf H.J., Herrlich P.
UV-Induced Extracellular Factor From Human Fibroblasts
Communicates the UV Response to Non-Irradiated Cells
Cell, 37, 861-868, (1984)

Schwartz D.C., Cantor C.R.
Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed
Field Gradient Gel Electrophoresis
Cell, 37, 67-75, (1984)

- Sedgwick S.G.
in "Accuracy in Molecular Processes", Galas P.J.,
Kirkwood T.B.L., Rosenberger R.F. (eds.), Chapman and
Hall, London (1986)
- Seligy V.L., Thomas D.Y., Miki B.L.A.
Saccharomyces cerevisiae Plasmid, Scp or 2um: Intra-
cellular Distribution, Stability and Nucleosomal-like
Packaging
Nucl. Acid. Res., 8, No.15, 3371-3391, (1980)
- Senecoff J.F., Bruckner R.C., Cox M.M.
The FLP Recombinase of the Yeast 2um Plasmid: Charac-
terization of its Recombination Site
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 7270-7274, (1985)
- Shenk T.E., Rhodes C., Rigby P.W.J., Berg P.
Biochemical Method for Mapping Mutational Alterations
in DNA with S1 Nuclease
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, No.3, 989-993, (1975)
- Siede W., Eckardt F.
Indications for an Inducible Component of Error-Prone
DNA Repair in Yeast
Br. J. Cancer, 49, Suppl. VI, 103-106, (1984)
- Siede W., Obermaier S., Eckardt F.
Influence of Different Inhibitors on the Activity of
the RAD54 Dependent Step of DNA Repair in Saccharo-
myces cerevisiae
Radiat. Environ. Biophys., 24, 1-7, (1985)
- Siede W., Eckardt-Schupp F.
DNA Repair Genes of Saccharomyces cerevisiae: Comple-
menting rad4 and rev2 Mutations by Plasmids which can-
not Be Propagated in E. coli
Curr. Genet., 11, 205-210. (1986)
- Sigurdson D.C., Gaarder M.E., Livingston D.E.
Characterization of the Transmission during Cytofunc-
tion Formation of the 2um DNA Plasmid from Saccharo-
myces cerevisiae
Mol. Gen. Genet., 183, 59-65, (1981)
- Silber J.R., Loeb L.A.
S1 Nuclease Does not Cleave DNA at Single-Base Mis-
Matches
Biochim. Biophys. Acta, 656, 256-264, (1981)
- Sinclair J.H., Steven B.J., Sanghavi P., Rabinowitz M.
Mitochondrial-Satellite and Circular DNA Filaments in
Yeast
Science, 156, 1234-1237, (1967)

Singleton C.K., Kilpatrick M.W., Wells R.D.
 S1 Nuclease Recognizes DNA Conformational Junctions
 between Left-Handed Helical (dT-dG)n.(dC-dA)n and Con-
 tiguous Right-Handed Sequences
 J. Biol. Chem., 259, No. 3, 1963-1967, (1984)

Southern E.M.
 Detection of Specific Sequences among DNA Fragments
 Separated by Gel-Electrophoresis
 J. Mol. Biol., 98, 503-517, (1975)

Stevens B.J., Moustacchi E.
 Gamma Satellite DNA and Small Twisted Circular Mole-
 cules in Yeast
 Exptl. Cell Res., 64, 259-266, (1971)

Sugino A., Drake J.W.
 Modulation of Mutation Rates in Bacteriophage T4 by a
 Base-Pair Change a dozen Nucleotides Removed
 J. Mol. Biol., 176, 239-249, (1984)

Sutherland B.M.
 in "The Enzymes", Boyer P.D. (ed), Academic Press, New
 York, 482-515, (1981)

Sutton A., Broach J.R.
 Signals for Transcription Initiation and Termination
 in the *Saccharomyces cerevisiae* Plasmid 2um Circle
 Mol. Cell. Biol., 5, No.10, 277-2780, (1985)

Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J.
 The Double Strand Break Repair Model for Recombination
 Cell, 33, 25-35, (1983)

Tabak H.F.
 Absence of 2um DNA Sequences in *Saccharomyces*
cerevisiae Y-379-5D
 FEBS Lett., 84, 67-70, (1977)

Taketo M., Jazwinski S.M., Edelman G.M.
 Association of the 2um DNA Plasmid with Yeast Folding
 Chromosomes
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, No.6, 3144-3148, (1980)

Tsao S.G.S., Brunk C.F., Pearlman R.E.
 Hybridization of Nucleic Acids Directly in Agarose Gels
 Anal. Biochem., 131, 365-372, (1983)

Unrau P., Wheatcroft R., Cox B.S.
 Excision of Pyrimidine Dimers from DNA of Ultraviolet
 Irradiated Yeast
 Mol. Gen. Genet., 113, 359-362, (1971)

Van Zeeland A.A., Smith C.A., Hanawalt P.C.
 Sensitive Determination of Pyrimidine Dimers in DNA of
 UV Irradiated Mammalian Cells: Introduction of T4 Endo-
 nuclease V into frozen and Thawed Cells
 Mut. Res., 82, 173-189, (1981)

- Veit B.E., Fangman W.L.
Chromatin Organization of the *Saccharomyces cerevisiae*
2um Plasmid Depends on Plasmid-Encoded Products
Mol. Cell. Biol., 5, No.9, 2190-2196, (1985)
- Vogt V.M.
Purification and Further Properties of Single-Strand-
Specific Nuclease from *Aspergillus oryzae*
Eur. J. Biochem., 33, 192-200, (1973)
- Volkert F.C., Broach J.R.
Site-Specific Recombination Promotes Plasmid Amplifi-
cation in Yeast
Cell, 46, 541-550, (1986)
- Wahl G.M., Stern M., Stark G.R.
Efficient Transfer of Large DNA Fragments from Agarose
Gels to Diazobenzylxymethyl-Paper and Rapid Hybridi-
zation by Using Dextrane Sulfate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3683-3687, (1979)
- Waldstein E.A., Peller S., Setlow R.B.
UV-Endonuclease from Calf-Thymus with Specificity
Toward Pyrimidine Dimers in DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3746-3750, (1979)
- Walker G.C.
Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribo-
nucleic Acid Damage in *Escherichia coli*
Micobiol. Rev., 48, 60-93, (1984)
- Wallace S.S.
Detection and Biological Consequences of DNA Base
Damage
Int. Conf. on Mechanism of DNA Damage and Repair
Gaithersburg, MA, USA, (1985)
- Ward J.F.
Biochemistry of DNA Lesions
Rad. Res., 103, S103-111, (1985)
- Ward J.F.
Ionizing Radiation Induced DNA Damage Identities and
DNA Repair
in Basic Life Sciences, "Mechanisms of DNA Damage and
Repair", Simic M.G., Grossman L., Upton A.C. (eds.),
38, 135-138, (1986a)
- Ward J.F.
Mechanisms of DNA Repair and Their Potential Modifica-
tion for Radiotherapy
Int. J. Rad. Onc. Biol. Phys., 12, 1027-1032, (1986b)
- Waters R., Moustacchi E.
Disappearance of Ultraviolet-Induced Pyrimidine Dimers
from Nuclear-DNA of Exponential and Stationary Phase
Cells of *Saccharomyces cerevisiae* Following Various
Postirradiation Treatments
Biochem. Biophys. Acta, 353, 407-419, (1974)

- Waters R., Moustacchi E.
Fate of Ultraviolet-Induced Pyrimidine Dimers in Mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae* Following Various Postirradiation Cell-Treatments
Biochem. Biophys. Acta, 366, 241-250, (1974)
- Warters R.L., Childers T.J.
Radiation-Induced Thymine Base Damage in Replicating Chromatin
Rad. Res., 90, 564-574, (1982)
- Weintraub H.
Recognition of Specific DNA Sequences in Eukaryotic Chromosomes
Nucl. Acid. Res., 8, No 20, 4745-4753, (1980)
- Weintraub H.
Assembly and Propagation of Repressed and Derepressed Chromosomal States
Cell, 42, 705-711, (1985)
- West St.C., Körner A.
Cleavage of Cruciform DNA Structures by an Activity from *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6445-6449, (1985)
- Wiegand R.C., Godson G.N., Radding C.M.
Specificity of the S1 Nuclease from *Aspergillus oryzae*
Jour. Biol. Chem., 250, No.22, 8848-8855, (1975)
- Wilcox D.R., Prakash L.
Incision and Post-Incision Steps of Pyrimidine Dimer Removal in Excision-Defective Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
J. Bact., 148, 618-623, (1981)
- Williamson V.M., Young E.T., Ciriacy M.
Transposable Elements Associated with Constitutive Expression of Yeast Alcohol Dehydrogenase-II
Cell, 2, 605-614, (1981)
- Wogan G.N., McMahon G.
Intragenomic Localization of Carcinogen-DNA Damage
Basic Life Sciences "Mechanisms of DNA Damage and Repair", Simic M.G. et al. (eds), 38, Plenum Press (1986)
- Yang E., Friedberg E.C.
Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* RAD1 Gene
Mol. Cell. Biol., 4, 2161-2169, (1984)
- Yarosh D.B.
The Role of O6-Methylguanine DNA Methyltransferase in Cell Survival, Mutagenesis and Carcinogenesis
Mut. Res., 145, 1-16, (1985)

Yoshizawa K., Furuno I., Yada T., Matsudaira H.
Induction and Repair of Strand Breaks and 3'-Hydroxy
Terminals in DNA of Mouse-Brain Following Gamma-Irra-
diation
Biochim. Biophys. Acta, 521, 1, 144 ff, (1978)

Zakian V., Brewer B.J., Fangman W.L.
Replication of Each Copy of the Yeast 2 Micron DNA
Plasmid Occurs during the S-Phase
Cell, 17, 923-934, (1979)

Lebenslauf:

Name	Eva-Maria Geigl
Geburtstag	24. März 1957
Geburtsort	Stuttgart

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1964-1967	Volksschule Stuttgart-Botnang
1967-1976	Ev. Mörike-Gymnasium Stuttgart
1977	Studium der Chemie an der Universität Tübingen
1977-1979	Studium der Chemie an der Universität München
1980-1983	Studium der Biologie und Chemie für das Höhere Lehramt an der Universität München
1983	Wissenschaftliche Prüfung für das Höhere Lehramt in Biologie und Chemie an der Universität München
1983-1984	Werkstudent an der GSF, Neuherberg
1984-1987	Doktorarbeit an der GSF, Institut für Strahlenbiologie, Neuherberg Betreuung durch Priv. Doz. Dr. F. Eckardt-Schupp und Prof. Dr. Dr. U. Hagen

